



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Aplicación de un método analítico rápido y
confiable para la cuantificación de
medroxiprogesterona acetato suspensión
inyectable**

TESIS

Para optar el Título de Segunda Especialidad Profesional en
Industria Farmacéutica

AUTOR

Leonardo Jesús GIRALDO BARDALAMA

ASESOR

Norma Julia RAMOS CEVALLOS

Lima, Perú

2017



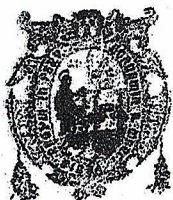
Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Giraldo L. Aplicación de un método analítico rápido y confiable para la cuantificación de medroxiprogesterona acetato suspensión inyectable [Tesis de segunda especialidad]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2017.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
UNIDAD DE POSGRADO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
EL TÍTULO DE SEGUNDA ESPECIALIDAD PROFESIONAL EN INDUSTRIA FARMACÉUTICA

Siendo las 08:00 hrs. del 30 de noviembre de 2017 se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por el Dr. José Roger Juárez Eyzaguirre e integrado por los siguientes miembros: Dra. Norma Julia Ramos Cevallos (Asesora), Mg. Gustavo Vladimir Bravo Orellana, Mg. Bertran Santiago Trujillo y el Mg. Amadeo Collado Pacheco; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: "APLICACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO RÁPIDO Y CONFIABLE PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MEDROXIPROGESTERONA ACETATO SUSPENSIÓN INYECTABLE" presentado por el Q.F. LEONARDO JESÚS GIRALDO BARDALAMA.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar el Título de Segunda Especialidad Profesional en Industria Farmacéutica. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

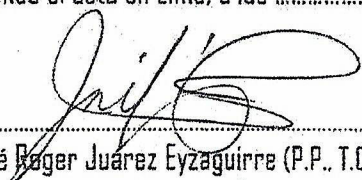
A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

EXCELENTE (19)

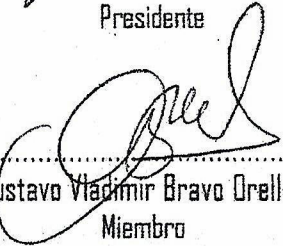
Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Q.F. LEONARDO JESÚS GIRALDO BARDALAMA, el Título de Segunda Especialidad Profesional en Industria Farmacéutica.

Siendo las 09:30 hrs. se levanta la sesión.

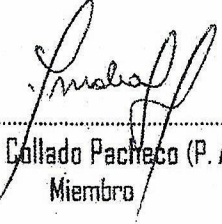
Se extiende el acta en Lima, a las 09:30 hrs. del 30 de noviembre de 2017.


Dr. José Roger Juárez Eyzaguirre (P.P., T.C.)
Presidente


Dra. Norma Julia Ramos Cevallos (P. Aux., T.C.)
Miembro - Asesora


Mg. Gustavo Vladimir Bravo Orellana (P.P., T.P.)
Miembro


Mg. Bertran Santiago Trujillo (P. Aux., T.P.)
Miembro


Mg. Amadeo Collado Pacheco (P. Aux., T.P.)
Miembro

Observaciones:

DEDICATORIA

Esta Tesis está dedicada a mi familia completa por el apoyo incondicional, a Martha por ser mi compañera fiel todos estos años, darme la paz y tranquilidad que necesitaba y a esos maravillosos hijos Leonardo y Piero, a quienes les dedico especialmente este trabajo y todo lo bueno que pueda hacer de acá en más y les agradezco su alegría lo cual me motiva a seguir adelante contra cualquier obstáculo.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: Por su infinita misericordia, por darme la vida, cuidarme y hacer posible la realización de este trabajo y poder cumplir mi anhelo y la de mis queridos padres.
A Él con profundo agradecimiento y amor.

A mis padres por educarme y convertirme en una persona de bien, integra y honesta.

A mi familia, por su apoyo incondicional, permanente aliento que hizo posible la realización de este trabajo; gracias por estar siempre a mi lado.

Un agradecimiento especial, por el apoyo y el asesoramiento para la realización de presente trabajo, gracias: Dra. Norma Julia Ramos Cevallos

A Medifarma S.A en las personas de su Director Técnico, Dr. Luis Kanashiro y su Gerente de Control de Calidad, Dra. Elba Lau por el apoyo y facilidades brindadas.

Por último, agradecer a la gente que ha compartido conmigo todo este tiempo, familia, amigos, compañeros de estudio y trabajo, los buenos y mejores momentos de esta gran etapa de mi vida, a todos ¡GRACIAS!

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

SUMMARY

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Situación problemática	1
1.2 Formulación del problema	1
1.3 Justificación de la investigación	1
1.4 Justificación práctica:.....	2
1.5 Objetivos de la investigación	2
1.5.1 Objetivo general	2
1.5.2 Objetivos específicos	2
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO	3
2.1 Bases teóricas	3
2.1.1 Medroxiprogesterona acetato (MPA)	3
2.1.2 Cromatografía de líquidos.....	4
2.1.3 Retos que la UHPLC plantea a la instrumentación analítica	5
2.2 Antecedentes del Problema	16
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....	17
3.1 Tipo y diseño de investigación	17
3.2 Población de estudio	17
3.3 Tamaño de muestra.....	17
3.4 Técnicas de recolección de datos	17
3.5 Análisis e interpretación de la información	17
3.6 Parte experimental.....	18
CAPÍTULO IV: RESULTADOS.....	28
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	56
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	57
ANEXO	61

RESUMEN

Objetivo: desarrollar un método rápido y confiable para la cuantificación de medroxiprogesterona acetato suspensión inyectable. **Materiales:** muestras de medroxiprogesterona acetato suspensión inyectable. **Método:** con la intención de cuantificar el principio activo (medroxiprogesterona acetato) mediante un sistema cromatográfico por UHPLC el cual reducirá el tiempo en respuesta de Control de calidad, a fin de obtener los resultados adecuados para diseñar la metodología analítica correcta. Una vez establecidas las condiciones cromatográficas finales con los parámetros definidos para el trabajo, se efectuó la validación del método desarrollado y su posterior comparación de beneficios del nuevo método (horas análisis y costo). **Resultado:** después de evaluar varios sistemas cromatográficos el más adecuado resultó ser el que utilizaba como fase móvil: Buffer acetato 20mM pH 5,0: metanol (40:60), empleando la columna Kinetex 2,6 μ m XB-C18 100A 50 x 2,1 mm a flujo 0,5 mL/min; temperatura 35 °C; volumen de inyección de 1 μ L empleando un detector UV a 245 nm el cual fue finalmente validado de acuerdo a guías internacionales como la ICH Q2 (R1), Farmacopea USP y procedimientos internos del laboratorio. El método resultó ser específico para medroxiprogesterona acetato lineal, preciso y exacto en el intervalo de 0,096 mg/mL a 0,144 mg/mL con un coeficiente de determinación de 0,9995; al comparar resultados de dos lotes evaluados con el método tradicional (USP), el método por UHPLC no se encontró variación significativa. Existe una reducción del 60% de horas hombre; 80% de horas máquina y de 22% del costo de reactivos y mano de obra en relación al método tradicional (USP) empleado en la cuantificación de medroxiprogesterona acetato suspensión inyectable. **Conclusión:** se ha desarrolló y validó un método analítico para cuantificar medroxiprogesterona acetato en una suspensión inyectable por Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UHPLC) pero además hay una reducción de costo significativo con el método tradicional.

Palabras Clave. Medroxiprogesterona acetato, Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UHPLC), validación, desarrollo de método analítico.

SUMMARY

Objective: to develop a rapid and reliable method for the quantification of medroxyprogesterone acetate injectable suspension. **Materials:** samples of medroxyprogesterone acetate injectable suspension. **Method:** with the intention of quantifying the active principle (medroxyprogesterone acetate) by means of a chromatographic system by UHPLC which will reduce the time in response of Quality Control, in order to obtain the adequate results to design the correct analytical methodology. Once the final chromatographic conditions were established with the parameters defined for the work, the validation of the method developed and its subsequent comparison of benefits of the new method (hours analysis and cost) was carried out. **Result:** after evaluating several chromatographic systems, the most suitable one was found to be the one used as mobile phase: 20 mM acetate buffer pH 5,0: methanol (40:60), using the Kinetex column 2,6 μ m XB-C18 100A 50 x 2,1 mm at flow 0,5 mL/min; temperature 35 °C; injection volume of 1 μ L using a UV detector at 245 nm which was finally validated according to international guidelines such as ICH Q2 (R1), USP Pharmacopoeia and internal laboratory procedures. The method was specific for medroxyprogesterone linear, precise and accurate acetate in the range of 0.096 mg/mL to 0.144 mg/mL with a coefficient of determination of 0.9995; When comparing results of two batches evaluated with the traditional method (USP), the method by UHPLC did not find significant variation. There is a reduction of 60% in man-hours; 80% of the hours of machine and 22% of the cost of reagents and labor in relation to the traditional method (USP) used in the quantification of medroxyprogesterone acetate injectable suspension. **Conclusion:** an analytical method has been developed and validated to quantify medroxyprogesterone acetate in an injectable suspension by ultra high resolution liquid chromatography (UHPLC) but there is also a significant cost reduction with the traditional method.

Keywords. Medroxyprogesterone acetate, ultra high resolution liquid chromatography (UHPLC), validation, development of analytical method.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Situación problemática

El rápido desarrollo de rellenos de columnas cromatográficas de tamaño de partícula inferior a 3 μm y de equipos de HPLC que permiten trabajar a presiones y velocidades elevadas en la Cromatografía Líquida (HPLC) clásica, ha propiciado el auge de nuevas técnicas de HPLC denominadas UHPLC (Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución).

Esta técnica permite obtener mejoras importantes en la resolución cromatográfica, rapidez y sensibilidad analítica respecto a la HPLC tradicional. Por tal motivo algunos compuestos invierten un tiempo considerable en el uso de equipos uno de estos compuestos es medroxiprogesterona acetato que, aparte de usar un tiempo considerable en los equipos el tratamiento de las muestras es por extracción y emplea solventes orgánicos que son perjudiciales para el personal analista y contaminan el medio ambiente.

1.2 Formulación del problema

¿Cómo realizar un método analítico rápido y confiable para la cuantificación de medroxiprogesterona acetato suspensión inyectable?

1.3 Justificación de la investigación

El propósito de la realización de este trabajo de investigación, fue evaluar el anticonceptivo inyectable de depósito trimestral, acetato de medroxiprogesterona (DMPA) que es un método bastante empleado por muchas mujeres de diversas edades en el mundo; convirtiéndose, por ejemplo, en el tercer método más común entre las mujeres casadas en países en desarrollo, usado por más de 11 millones de mujeres en más de 90 países en el mundo (Rodríguez Ferrá, Gómez García, & Conde Martín, 2003). En 1998, se calculaban en 12 000 000 las usuarias de inyectables que contenían sólo progestágenos, de los cuales el más usado por amplia mayoría es el “Depo - provera”. En Perú, existe una alta motivación por limitar el tamaño familiar y espaciar la ocurrencia de los nacimientos. El conocimiento de métodos para la regulación de la reproducción es muy amplio entre la población peruana y entre todos los grupos poblacionales. Casi todas las mujeres en edad fértil (99,3%)

conocen o han oído hablar de algún método de planificación familiar y la inyección como método es conocida por 98,3% de mujeres, y uno de los métodos modernos más usados alguna vez por las mujeres (57.2%) (Seuc Jo, Santana Pérez, González Suárez, Arranz Calzado, & Fernández López, 2000). Debido al alto consumo se requiere disminuir el tiempo de análisis; así como, evaluar la posibilidad de desarrollar una metodología menos dañina para el analista así como perjudicial al medio ambiente.

1.4 Justificación práctica:

Con la presente investigación se amplía el conocimiento sobre la cuantificación de medroxiprogesterona acetato para contribuir a tener un método rápido y confiable; así también, se reducir el consumo de solvente en su análisis.

1.5 Objetivos de la investigación

1.5.1 Objetivo general

Desarrollar un método rápido y confiable para la cuantificación de medroxiprogesterona acetato suspensión inyectable.

1.5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el método analítico según farmacopea USP para medroxiprogesterona acetato suspensión inyectable.
- Comparar el costo - beneficio del método analítico por UHPLC.
- Garantizar la especificidad del método analítico por UHPLC.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Bases teóricas

2.1.1 Medroxiprogesterona acetato (MPA)

Es un esteroide de 21 carbonos de la familia del pregnano con actividad selectiva muy similar al de la progesterona (Brunton, Chabner, & Knollmann, 2012).

Nomenclatura

CAS (Chemical Abstracts Service): Reg. No.: 71-58-9

Chem. Abstr. Name: (6 α)-17-(Acetyloxy)-6-methylpregn-4-ene-3,20-dione

Nombre según sistema IUPAC: 17-Hydroxy-6 α -methylpregn-4-ene-3,20-dione, acetate

Sinónimos

17 α -Acetoxy-6 α -methylprogesterone; depomedroxyprogesterone acetate; depo-progestin; depot-medroxyprogesterone acetate; DMPA; 17-hydroxy-6 α -methyl-progesterone acetate; 17 α -hydroxy-6 α -methylprogesterone acetate; MAP; medroxy-progesterone 17-acetate; 6 α -methyl-17-acetoxyprogesterone; 6 α -methyl-17 α -hydroxyprogesterone acetate.

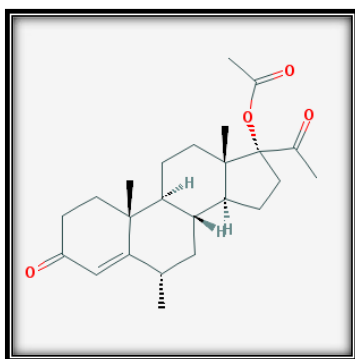
Datos químicos

Fórmula : C₂₄H₃₄O₄

Masa molecular relativa : 386,5

Estructura química:

Figura 1. Medroxiprogesterona acetato



Descripción: polvo cristalino blanco a blanquecino, inodoro; se funde a unos 205 °C, es estable en el aire atmosférico.

Solubilidad: insoluble en agua completamente soluble en cloroformo, soluble en acetona o dioxano, poco soluble en alcohol o metanol, ligeramente soluble en éter (Alfonso R, 2000).

2.1.2 Cromatografía de líquidos

Breve reseña histórica

La cromatografía, descrita por primera vez en 1906 por el italiano nacido en Rusia Mikhail Tswett, se utilizó inicialmente para separar pigmentos vegetales, clorofilas y xantofilas, mediante el empleo de un tubo de vidrio (en vertical) relleno de carbonato cálcico en polvo (fase estacionaria) y usando éter como eluyente (fase móvil). La solución recorrió el tubo y los componentes individuales de la mezcla migraron hacia abajo con diferentes velocidades; la columna quedó marcada con bandas horizontales de distintos colores correspondientes a pigmentos diferentes. El resultado fue llamado *cromatograma*, justificando el nombre que se dio a la técnica *chroma*, del griego, que significa color, y *graphein* que significa escribir.

El avance posterior en fabricación de columnas, rellenos y detectores en continuo permitió el nacimiento de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC: *high-pressure liquid chromatography*), luego denominada de alta resolución (HPLC: *high-performance liquid chromatography*), nombre que se propuso para distinguir esta nueva tecnología de los clásicos métodos de cromatografía líquida a presión atmosférica, que se siguen usando con fines preparativos. Desde entonces la cromatografía líquida de alta resolución viene desarrollándose a pasos agigantados, debido principalmente a su versatilidad, alta sensibilidad, fácil adaptabilidad, precisión, la posibilidad de utilizar especies no volátiles o inestables térmicamente, y su gran aplicabilidad a sustancias de interés para la industria, la investigación y en general para la sociedad actual. Ejemplos significativos de aplicaciones de la cromatografía HPLC los constituyen el análisis de aminoácidos, proteínas, fármacos, biocombustibles, drogas, hidratos de carbono, grasas, pesticidas,

contaminantes alimenticios, antibióticos vitaminas o efluentes. (Plou Gasca & Salas, 2011).

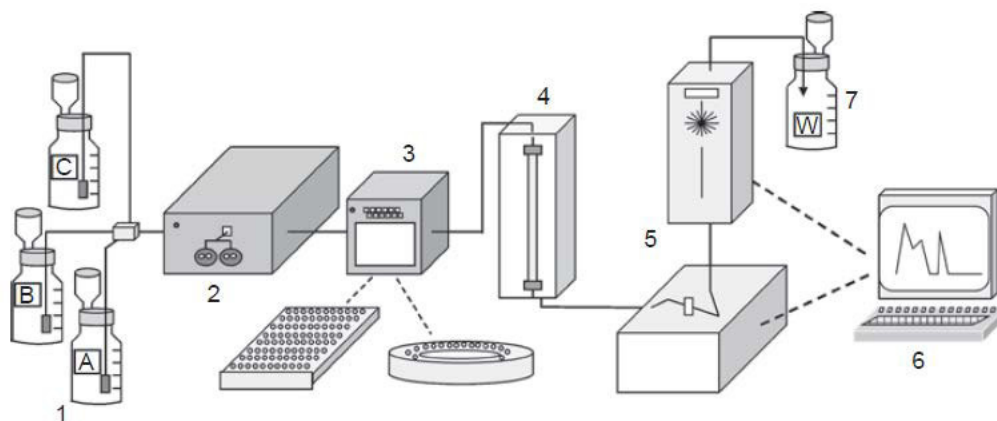
Ya sea que la presión máxima de funcionamiento sea de 600 bar o 1000 bar, se requiere una nueva instrumentación para operar adecuadamente las columnas con partículas menores de 2 μm . (Fountain & Iraneta, 2012).

2.1.3 Retos que la UHPLC plantea a la instrumentación analítica

Todo equipo de cromatografía líquida de alta resolución debe disponer de, al menos, los siguientes módulos (Figura 2) (Plou Gasca & Salas, 2011):

- (1) Reservorios o botellas para la fase móvil.
- (2) Sistema de bombeo.
- (3) Inyector (manual o automático).
- (4) Horno.
- (5) Uno o varios detectores en serie.
- (6) Sistema de tratamiento de resultados.
- (7) Botella para residuos.

Figura 2. Principales componentes de un equipo de HPLC:



Hay tres enfoques modernos principales en los métodos de HPLC que permiten reducir el tiempo analítico sin comprometer la resolución y la eficiencia de separación el uso de columnas monolíticas, la cromatografía líquida a altas temperaturas y la cromatografía líquida a presiones ultra-altas utilizando partícula sub-2-micras empacado en columnas (Nguyen, Guillaume, Rudaz, & Veuthey, 2006) (Wu & Clausen, 2007), como una nueva tendencia, la aplicación de las columnas de núcleo fundido ha llegado a ser

utilizado en aplicaciones de LC rápido (Gritti, Cavazini, Marchetti, & Guiochon, 2007)

A continuación se detallara lo más resaltante de un sistema UHPLC

Bomba

El sistema de suministro de disolvente, la bomba, utilizado para cualquier separación cromatográfica debe ser capaz de proporcionar la velocidad del flujo y el paso de la fase móvil en todo momento. La mezcla de alta presión se realiza con un sistema de múltiples bombas y es típica de sistemas binarios de suministro de disolvente, mientras que la mezcla de una baja presión se realiza con una sola bomba y se usa en un sistema de suministro de disolvente cuaternario. La principal diferencia operativa entre estos dos tipos de sistemas de bombeo, aparte del número de disolventes diferentes que se pueden utilizar simultáneamente, es la ubicación de la mezcla de disolventes. En un sistema de mezcla de alta presión (Figura 3), los disolventes se mezclan después de la bomba, y por lo general sufren alguna expansión o contracción. El caudal real bombeado puede ser diferente de lo programado, lo que se compensa con el uso de algoritmos de software. Por el contrario, en un sistema de mezcla de baja presión (o cuaternario) (Figura 3), los disolventes se mezclan antes de la bomba. Los sistemas de mezcla de alta presión típicamente tienen volúmenes de retardo de gradiente más bajos (por ejemplo, volumen entre la bomba y la cabeza de la columna), lo cual es importante para el análisis de gradiente de alto rendimiento. Este tipo de mezclado es especialmente útil para los caudales bajos, como los usados con los diámetros de columnas pequeños (≤ 2.1 mm) o para las separaciones de las moléculas grandes que se requieren de los flujos de flujo más lentos debido a sus velocidades lineales óptimas más bajas.

Los parámetros que hay que considerar cuando se programan gradientes son el tiempo de equilibrado, la miscibilidad de los disolventes y su pureza, la realización de blancos, la reproducibilidad de tiempos/áreas y la compatibilidad con el detector. En la Tabla 1 se comparan las propiedades de ambos tipos de gradientes.

Figura 3. Esquema del sistema de mezcla de alta y baja presión

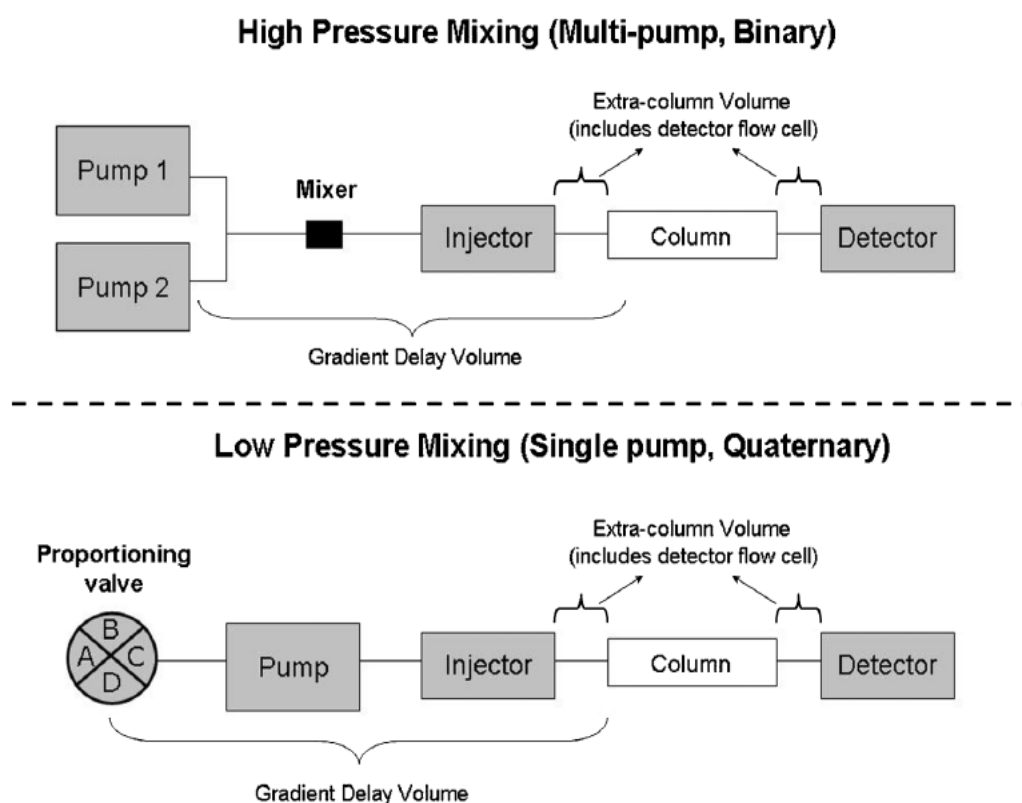


Tabla 1. Comparación de Gradientes en Alta y Baja Presión

Parámetro	Alta Presión	Baja Presión
Requerimientos técnicos	Dos o más bombas	Una única bomba
Calidad de la mezcla	Buena	Buena
Desgasificación de la fase móvil	No necesaria	Imprescindible
Flujos bajos	No adecuada	Adecuado
Porcentajes bajos de algún disolvente	Adecuado	No adecuado
Volumen de sistema	Pequeño	Grande (> 1 mL)

Los principales problemas que puede presentar una bomba son:

La línea base siempre presenta ruido, que se conoce como rizado. Las causas de un rizado excesivo de la línea base pueden ser eventuales (burbujas, fugas, mal ajuste de los pistones, compresibilidad del disolvente empleado, etc.), constantes (rozamiento mecánico de las partes internas de la bomba, holgura entre las piezas móviles de la bomba) o ajenas a la bomba (sensor de presión, detector, sistema de registro, etc.) y cuando el flujo real es distinto al estipulado. Puede ser debido a la presencia de burbujas (por no desgasificar correctamente la fase móvil) o a la existencia de fugas en algún punto del sistema. También puede ser consecuencia de la presencia de partículas sólidas en el disolvente (mal filtrado) (Plou Gasca & Salas, 2011)

Para las separaciones UHPLC, ambos sistemas de mezcla fueron reestructurados por los fabricantes para lograr los beneficios de rendimiento esperados de las columnas de las pequeñas empresas. Todas las características de un sistema de HPLC se modificaron para satisfacer las demandas de rendimiento mientras que de forma rutinaria y robusta pudieron soportar presiones de operación mucho más altas. Como resultado, muchos fabricantes incorporaron cambios en los materiales y diseños de los émbolos, sellos, válvulas de retención y accesorios (Fountain & Iraneta, 2012).

Inyectores

En UHPLC, la parte más difícil del sistema es la introducción de muestras a presiones muy altas en un volumen miniaturizado. Esto fue estudiado por Jorgenson *et al.* y por Lee *et al.*, que desarrollaron la primera inyección dividida estática y después la válvula de presión equilibrada (MacNair, Lewis, & Jorgenson, 1997) (Lippert, Baomin, Wu, & Lee, 1999). Una consideración adicional es la estabilidad mecánica de las columnas de UHPLC que se someten a inyecciones repetidas a presión elevada y condiciones de gradiente en las que la presión puede ciclar varios miles de psi dentro de una carrera. Hay dos tipos principales de inyectores: estilo de loop fijo (LF) y flujo variable (FV) (a veces denominado inyector directo).

Independientemente del tipo de inyector usado para las separaciones UHPLC, muchos de los componentes fluídicos tuvieron que ser rediseñados para proporcionar un funcionamiento robusto bajo alta presión, mientras que disminuyendo la dispersión y el volumen de retardo de gradiente. Al igual que con las bombas UHPLC, esto implicó el rediseño de la aguja, el asiento de la aguja, las válvulas del inyector, las conexiones y los tubos. Hoy en día existen sistemas UHPLC comerciales que utilizan ambos tipos de inyectores para obtener resultados óptimos dependiendo de la aplicación como se indica en la Tabla 2.

Otro componente asociado con el inyector es el compartimento de termostato de columna, que también puede ser una fuente primaria de dispersión de columna adicional y volumen de retardo de gradiente. (Fountain & Iraneta, 2012).

Tabla 2. Características de los instrumentos HPLC seleccionados

(* = Desconocido, LF = loop fijo y FV = flujo variable)

Nombre	Vendedor	Máxima presión (psi)	Rango de flujo mL/min	Tipo de inyector	Tiempo de inyección (s)	Volumen de retardo en la gradiente (μL)
Acquity UPLC I-Class	Waters	18 000	0,01 - 2	LF o FV	< 15	< 95
Acquity UPLC H-Class	Waters	15 000	0,01 - 2	FV	< 30	< 400
Acquity UPLC Ultimate 3000	Waters	15 000	0,01 - 2	LF o FV	15 a 30	< 120
RSLC	Dionex	15 000	0,1 - 8	LF o FV	15	293
1290 Infinity LC	Agilent	17 400	0,001 - 5	FV	19 - 25	< 140
Accela High Speed LC	ThermoFisher	15 000	0,001 - 5	FL	< 60	70 (solo bomba)
Alliance 2695 HPLC	Waters	5 000	Hasta 10	LF	40 - 45	< 650
Neera	Shimatzu	18 800	0,0001 - 5	LF o FV	10	< 185
Flexar FX 15	PerkinElmer	15 000	*	*	8	*
X-LC	Jasco	15 000	Hasta 5	*	30	*
PLATINblue	Knauer	15 000	Hasta 5	*	15 - 60	110

En cuanto a los viales, existen innumerables posibilidades dependiendo del material de fabricación (plástico, vidrio ámbar o transparente, etc.), tipo de boca (encapsulable, roscada, etc.), composición del septum (silicona PTFE –teflón-, o mezcla de ambos), volumen (0,3-20 mL), presencia de inserto para muestras de volúmenes reducidos, etc. (Plou Gasca & Salas, 2011)

Detector

Es preferible que el detector no se vea afectado por cambios en la composición de la fase móvil (gradientes), que tenga un tiempo de respuesta inferior a 0,3 segundos y un volumen de celda lo más pequeño posible, de modo que no contribuya al ensanchamiento de los picos. El volumen de celda del detector suele ser de unos pocos microlitros, por lo que toma la forma de un tubo estrecho capilar con un cierto ensanchamiento en la zona de medida, llamada micro cámara. Es fundamental no sobrepasar los límites máximos de presión y caudal para cada tipo de detector.

Los detectores pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- (1) Detectores universales
- (2) Detectores selectivos.

Otra clasificación de los detectores se puede realizar por su fundamento instrumental:

- (1) Detectores ópticos: de absorbancia UV-VIS,
- (2) *Detectores específicos.*
- (3) *Detectores eléctricos.*
- (4) *Detectores de técnicas acopladas.*

En la Tabla 3 se recopilan los límites de detección de los principales tipos de detectores utilizados en HPLC. (Plou Gasca & Salas, 2011)

Tabla 3. Características de los principales detectores utilizados en HPLC

Detector	Tipo	Límite de Detección
Absorbancia	Selectivo	100 pg - 1 ng
Fluorescencia	Selectivo	1 - 10 pg
Índice de refracción	Universal	100 ng - 1 µg
Quimioluminiscencia	Selectivo	0.1 - 1 pg
Electroquímico	Selectivo	10 pg - 1 ng
Evaporativo de light-scattering	Universal	1 - 100 ng
Conductividad	Selectivo	500 pg - 1 ng
Espectrometría de masas	Universal	100 pg - 1 ng
Aerosol cargado (CAD)	Universal	100 pg - 10 ng

Columnas cromatográficas

La columna es la parte más importante del sistema cromatográfico. Las variables importantes a considerar en una columna HPLC, además de la naturaleza química de su fase estacionaria, son su longitud, diámetro, el tamaño de partícula, así como el diámetro de poro y la homogeneidad entre las partículas.

La carcasa de las columnas suele ser de acero inoxidable, ya que se trata de un material inerte, resistente a las altas presiones y con el interior liso, aunque también existen columnas de vidrio, PEEK e incluso de polietileno flexible.

Una primera exigencia para la fase estacionaria es su estabilidad y resistencia a las altas presiones.

Se han desarrollado columnas de alto rendimiento, alta resolución y rápido para maximizar el rendimiento de las columnas empaquetadas. Aunque las columnas de partículas son dominantes en las aplicaciones principales, se considera que la resistencia hidráulica resultante de la morfología de partículas es el límite para el uso de partículas menores de 1 micrómetro. La columna monolítica, que supera los límites de las columnas tradicionales

impuestas por el backpressure se considera ser la nueva generación de HPLC. (Svec, 2003).

A continuación se detallaran dos tipos de columnas, es decir, columna monolítica y columna rellena o empacadas, como fases estacionarias para HPLC de rutina. Las microesferas de sílice son los materiales de embalaje más utilizados para las columnas empacadas. Mientras que para las columnas monolíticas, tanto la sílice porosa como los polímeros reticulados se utilizan frecuentemente. (Fekete, Oláh, & Fekete, 2012)

Columna monolítica

Es una columna de HPLC basada en sílice. Esta tecnología crea varillas altamente porosas de sílice con una estructura bimodal revolucionaria. La única pieza de gel de sílice polimérico de alta pureza es luego revestida en tubos PEEK para hacer el producto final.

Los mesoporos forman la estructura porosa fina (130A) del interior de la columna y crean un área de superficie muy grande en la que puede ocurrir la adsorción de los compuestos diana. La combinación única de macroporos y mesoporos permite que las columnas monolíticas de HPLC proporcionen excelentes separaciones en una fracción del tiempo en comparación con una columna de partículas estándar (Figura 4)

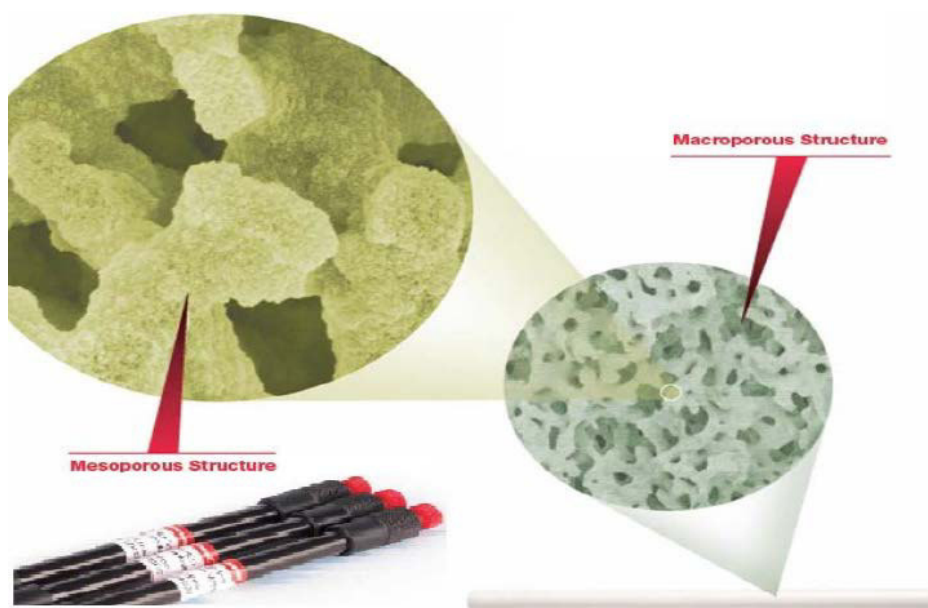


Figura 4. Columna Monolítica

La columna de HPLC tiene dos tipos de porosidad: externa e interna. La porosidad externa de las columnas de partículas es controlada por el tamaño de partícula, que es un factor importante para la eficiencia de la columna. La eficiencia de la columna está relacionada con el tamaño de partícula: cuanto menor es la partícula, mayor es la eficiencia de la columna y la contrapresión. En La figura 5 se presenta la comparación del material de relleno esférico y la sílice monolítica con imágenes SEM de partículas de sílice HPLC (5 μm) y sílice monolítica. (Leinweber & Tallarek, 2003)

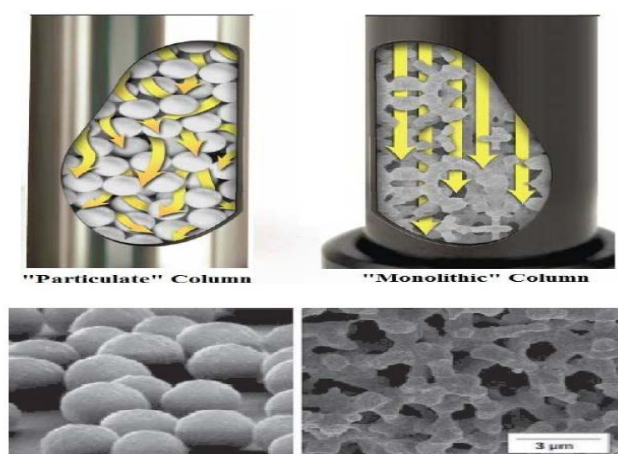


Figura 5. Comparación de columna Monolítica y Particulado

Columna rellena o encapsada

Son columnas empaquetadas con microesferas de sílice y son las más utilizadas. Aunque varias microesferas de polímero y cerámica se han utilizado como materiales de empaquetado, las microesferas de sílice son los materiales más investigados y utilizados. Las microesferas de sub-2 μm son actualmente las más usadas en el mercado de microesferas de sílice porosas. Para lograr una rápida separación sobre microesferas de sílice de cierto tamaño, un enfoque directo es aumentar la velocidad de flujo y, por lo tanto, la caída de presión a través de la columna. De este modo, se desarrolla y utiliza una cromatografía líquida de alta presión. Esta técnica impone un requisito mucho más estricto al sistema de bombeo y al sistema de flujo total debido a la presión de operación muy alta. (Hayes, Ahmed, Edge, & Zhang, 2014)<

La tabla 4 resume la estructura de las partículas y la química en fase estacionaria de los envases de cascara (Shell) de la última generación (Fekete, Oláh, & Fekete, 2012)

Tabla 4. Estructura de partículas y química en fase estacionaria de los envases de revestimiento (Shell) de nueva generación. (Szabolcs , Erzsébet, & Jeno", 2012)

Vendedor	Nombre Producto/Columna	Diámetro de partícula promedio (µm)	Espesor de cascara (Shell) (µm)	Química de fase estacionaria
Advanced Material Technology	Halo	2.7	0.5	C18, C8, HILIC, RP-amina, fenilhexil, pentafluorofenil
Advanced Material Technology	Halo Peptido-ES 160 A	2.7	0.5	C18
Agilent	Poroshell 300	5	0.25	C18, C8, C3
Agilent	Poroshell 120	2.7	0.5	EC-C18, SB C18
Sigma-Aldrich	Ascentis Express	2.7	0.5	C18, C8, HILIC, RP-amina, fenilhexil, pentafluorofenil
Sigma-Aldrich	Ascentis Express Peptide-ES 160 A	2.7	0.5	C18
Phenomenex	Kinetex	2.6	0.35	C18, XB-C18, C8, HILIC, pentafluorofenil
		1.7	0.23	
Macherey-Nagel	Nucleoshell	2.7	0.5	RP-18, HILIC
Thermo Scientific	Accucore	2.6	0.5	C18, aQ, RP-MS, HILIC, fenilhexil, pentafluorofenil
Sunniest	SunShell	2.6	0.5	C18
Commercially not available	Eiroshell	1.7	0.35	C18
		1.7	0.25	
		1.7	0.15	

Por su nombre, las partículas core Shell son una clase de partículas que contienen un núcleo y un revestimiento. El núcleo y el revestimiento pueden ser materiales diferentes o los mismos materiales con estructuras diferentes. La figura 6 muestra la representación esquemática de diferentes tipos de partículas core/Shell (núcleo/Revestimiento). El núcleo y el revestimiento se expresan en colores diferentes. El núcleo puede ser una sola esfera (Figura 6A) o la agregación de varias esferas pequeñas (Figura 6B). Es posible tener una cáscara hueca con una pequeña esfera en el interior, una estructura de cascabel o yema-revestida (Figura 6C). La estructura del revestimiento puede ser una capa continua (Figura 6 A-C) o la unión de esferas más pequeñas sobre una esfera de núcleo grande (Figura 6 D y E) o esferas de núcleo agregado (Figura 6F). Las estructuras complejas de núcleo-revestimiento pueden también ser hechas vía la incorporación de esferas más pequeñas en la cáscara (Figura 6G) o con los revestimientos múltiples (Figura 6H). Tanto el núcleo como la envoltura pueden ser sólidos no porosos o tener estructuras porosas deseables. Las partículas núcleo – revestimiento (core-Shell) utilizadas en la cromatografía se hacen usualmente del mismo material, sílice, pero con un núcleo sólido y un revestimiento poroso (Figura 6I). El tamaño de la partícula del núcleo, el espesor de la envuelta y la porosidad en la envuelta se ajustan para adaptarse a diferentes tipos de aplicaciones cromatográficas. (Hayes, Ahmed, Edge, & Zhang, 2014)

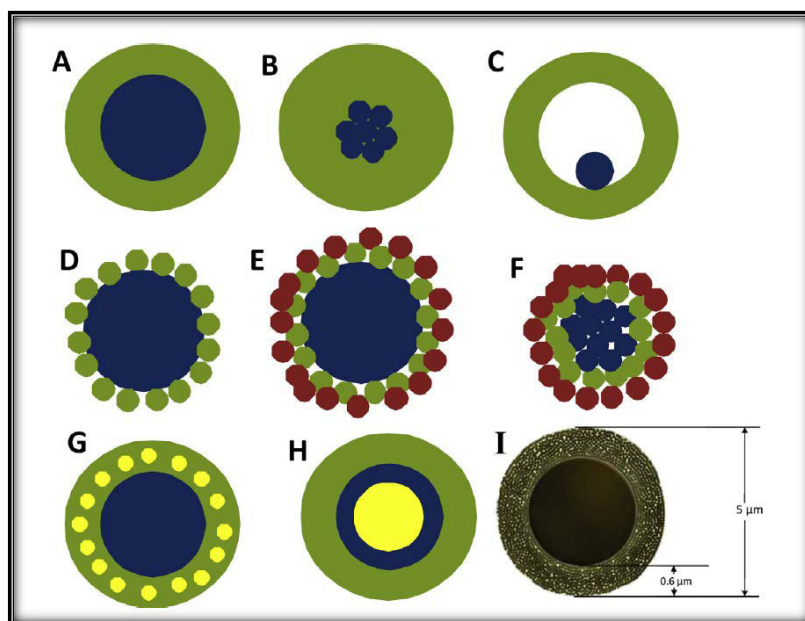


Figura 6. Representación esquemática de diferentes tipos de partículas núcleo-revestimiento (core-shell).

2.2 Antecedentes del Problema

El análisis de medroxiprogesterona acetato suspensión inyectable demora alrededor de 5 horas y cada inyección aproximadamente 30 minutos. Según la Farmacopea de los EE. UU., la fase móvil es fase normal (United States Pharmacopeial Convention, 2014) además se tiene que dar un tratamiento especial al equipo debido a que la mayoría de productos se desarrollan por fase reversa.

Recientemente, se ha despertado un gran interés en el campo farmacéutico en acelerar la cromatografía líquida, incrementar la productividad y disminuir el consumo de fase móvil reduciendo los costes y pérdidas. Para intentar cubrir esta demanda del mercado por los sistemas cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC) (PerkinElmer, 2009).

Por otra parte, las nuevas técnicas para la fabricación de material de embalaje monodisperso sub-2 mm con una resistencia mecánica adecuada, tal como acetato de híbridos puenteado (BEH) partículas y partículas de sílice de alta densidad, se han desarrollado (Mazzeo, Neue, Kele, & Plumb, 2005).

Se realizó la búsqueda bibliográfica para evaluar un método analítico el cual posteriormente se validó; Das Gupta empleo como fase móvil una solución acuosa de fosfato monobásico de potasio 0,02 M y metanol; de fase estacionaria una columna μ Bondapack CN 30 cm x 4 mm d.i. con un Detector UV a 254 nm. (Das Gupta, 1982) ; Segall y Colaboradores emplearon como fase móvil una mezcla de 30:70 de buffer nitrato de amonio y acetonitrilo; como fase estacionaria una columna C18 a una longitud de onda de 280 nm. (Segall, Hormaechea, Vitale, Perez, & Pizzorno, 1999); Cavina y Colaboradores emplearon como fase móvil Acetonitrilo y Agua (60: 40) con una columna L1 LiChrosorb RP – 18 y con un detector a 254 nm (Cavina, Valvo, & Alimenti, 1985); Jankana Burana-osot y colaboradores utilizan como fase móvil buffer acetato 0.02M pH 5 y metanol (65: 35) con una columna L1 (C18) y un arreglo de diodos (DAD) a 245 nm. (Burana-osot, Ungboriboonpisal, & Sriphong, 2006)

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

Considerando la farmacopea USP 37 se procedió a realizar la cuantificación de medroxiprogesterona acetato suspensión inyectable; así mismo se realizó la búsqueda bibliográfica de otra metodología para la determinación del principio activo el que se evaluó por UHPLC y se compararon los resultados, para luego validar la metodología seleccionada.

3.1 Tipo y diseño de investigación

El estudio fue de tipo experimental y comparativo; se buscó la mejor forma de cuantificar medroxiprogesterona acetato por UHPLC en el producto y se procedió a validarlo para garantizar que el método es específico y confiable.

3.2 Población de estudio

Muestras de medroxiprogesterona acetato suspensión inyectable

3.3 Tamaño de muestra

Se empleó muestras de medroxiprogesterona acetato suspensión inyectable de dos lotes para desarrollo y comparación y un lote para validación del método analítico.

3.4 Técnicas de recolección de datos

Se procedió con el análisis de producto para evidenciar la presencia del compuesto medroxiprogesterona acetato y su posterior cuantificación.

3.5 Análisis e interpretación de la información

La recolección de datos se realizó, siguiendo el procedimiento de muestreo aleatorio sistemático, según los días que se seleccionaron para la aplicación del instrumento. Se codificaron los datos para transformarlos en códigos numéricos y se clasificaron por categorías o numéricos. El procesamiento de los datos se realizó en Microsoft Office Excel 2010. Para la presentación y análisis de los datos se elaboraron tablas y figuras estadísticas.

3.6 Parte experimental

3.6.1 Materiales y Equipos

- Materiales de laboratorio diverso.
- Picnómetro con termómetro.
- Columna Cromatográfica KINETEX 2,6 μ m XB-C18 100A 50mm x 2,1mm y guarda columna UHPLC C18 for 2,1 mm.
- Membranas PVDF 0,22 μ m de porosidad.
- Viales de 2 mL para HPLC.
- Equipos (HPLC, Balanza analítica, Ultrasonido y Estufa) fueron calibrados y verificados para la realización de los análisis.

3.6.2 Reactivos

Para el desarrollo y validación del método analítico se emplearon los reactivos que se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Reactivos empleados para el análisis de un lote del producto medroxiprogesterona acetato suspensión inyectable.

Insumo / Material	USP	UHPLC
Cloruro de butilo	700 mL	
Hexano	300 mL	
Acetonitrilo	40 mL	
Progesterona	100 mg	
Cloroformo	75 mL	
Acetato de sodio		1,64 G
Ácido acético glacial		1 mL
Metanol		950 mL
Membrana filtrante de 0,45 μ m x 25 mm	4 unid	--
Membrana filtrante de 0,45 μ m x 47 mm	1 unid	--
Membrana filtrante de 0,22 μ m x 33 mm	--	4 unid
Membrana filtrante de 0,22 μ m x 47 mm	--	1 unid

3.6.3 Estándar

Para el desarrollo y validación del método analítico se empleó el siguiente estándar secundario: medroxiprogesterona acetato con potencia de 99,1%; fecha de expira marzo del 2019, trazado con un estándar primario lote I1K073.

3.6.4 Equipos

Los equipos empleados para el desarrollo y validación fueron: balanza analítica y potenciómetro marca Mettler Toledo; Cromatógrafo Líquido de Alta Performance 1260 DAD y VWD Marca Agilent Technologies; estufa marca Binder; baño maría marca Gemmy y Sonicador marca Branson.

3.6.4 Determinación del método analítico

De acuerdo al sistema cromatográfico propuesto por Jankana Burana-osot y colaboradores se evaluó en diferentes marcas de columnas cromatográficas y proporción de solventes para encontrar el método más adecuado para su uso en el departamento de control de calidad.

SISTEMA CROMATOGRÁFICO 1

Fase móvil	:	Buffer acetato 10 mM pH 5,0: metanol (30:70)
Columna	:	Synergi 2,5 µm Hydro RP 18 100 x 2 mm
Temperatura	:	35 °C
Flujo	:	0,2 mL/min
Volumen de inyección	:	0,3 µL
Detector	:	UV - DAD; 245 nm

SISTEMA CROMATOGRÁFICO 2

Fase móvil	:	Buffer acetato 10 mM pH 5,0: metanol (25:75)
Columna	:	Synergi 2,5 µm Hydro RP 18 100 mm x 2 mm
Temperatura	:	35 °C
Flujo	:	0,2 mL/min
Volumen de inyección	:	0,3 µL
Detector	:	UV - DAD; 245 nm

SISTEMA CROMATOGRÁFICO 3

Fase móvil	:	Buffer acetato 10 mM pH 5,0: metanol (25:75)
Columna	:	Zorbax SB-C18 150 x 3,0 mm x 1,8µm
Temperatura	:	35 °C
Flujo	:	0,4 mL/min
Volumen de inyección	:	0,5 µL
Detector	:	UV - VWD; 245 nm

SISTEMA CROMATOGRÁFICO 4

Fase móvil	:	Buffer acetato 10 mM pH 5,0: metanol (20:80)
Columna	:	Zorbax SB-C18 150 x 3,0 mm x 1,8µm
Temperatura	:	35 °C
Flujo	:	0,4 mL/min
Volumen de inyección	:	0,5 µL
Detector	:	UV - VWD; 245 nm

SISTEMA CROMATOGRÁFICO 5

Fase móvil	:	Buffer acetato 20 mM pH 5,0: metanol (35:65)
Columna	:	Kinetex XB-C18 100A 75 x 4,6 mm (2,6 µm)
Temperatura	:	35 °C
Flujo	:	1,2 mL/min
Volumen de inyección	:	2 µL
Detector	:	UV - DAD; 245 nm

SISTEMA CROMATOGRÁFICO 6

Fase móvil	:	Buffer acetato 20 mM pH 5,0: metanol (30:70)
Columna	:	Kinetex XB-C18 100A 75 x 4,6 mm (2,6 µm)
Temperatura	:	35 °C
Flujo	:	1,2 mL/min
Volumen de inyección	:	3 µL
Detector	:	UV - DAD; 245 nm

SISTEMA CROMATOGRÁFICO 7

Fase móvil	:	Buffer acetato 20 mM pH 5,0: metanol (40:60)
Columna	:	Kinetex 2,6 µm XB-C18 100A 50 x 2,1 mm
Temperatura	:	35 °C
Flujo	:	0,5 mL/min
Volumen de inyección	:	1 µL
Detector	:	UV - VWD; 245 nm

3.6.4 Desarrollo de los parámetros a Validar

Se hizo la validación del método analítico siguiendo estrictamente el procedimiento de operación estándar del Laboratorio Medifarma S.A. considerando la validación de la técnica analítica del tipo de determinación cuantitativa de los componentes en un producto terminado por UHPLC (Categoría I <1225> USP vigente). Se validaron los siguientes parámetros:

Especificidad	Si
Linealidad e Intervalo	
• Linealidad del sistema	Si
• Linealidad del método	Si
Exactitud	Si
Precisión	
• Repetibilidad instrumental	Si
• Repetibilidad del método	Si
• Precisión Intermedia	Si
Robustez	Si
Límite de Cuantificación (LC)	No
Límite de Detección (LD)	No

ESPECIFICIDAD

Analizar el placebo, según la técnica analítica: El resultado de análisis del placebo no debe dar una respuesta cuantificable (o no significativa, es decir menor al 1% de la respuesta del estándar). Esto indica que los excipientes no interfieren en el análisis del analito.

LINEALIDAD E INTERVALO

Linealidad de sistema

Preparar 5 concentraciones que cubran el rango de trabajo, al 50%, 75%, 100%, 125% y 150% de la concentración nominal de trabajo.

Criterio de aceptación:

Ecuación de la recta : $y = bx + a$

Coeficiente de correlación : Mayor a 0,999

Coeficiente de determinación : Mayor a 0,998

Homogeneidad de varianzas

(Test G de Cochran) : $G_{exp} < G_{tablas}$

Planteamiento de hipótesis para determinar si el factor concentración tiene influencia en los resultados.

H_0 : las varianzas son semejantes.

H_1 : las varianzas son diferentes.

$$G_{exp} = \frac{s_{max}^2}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2}$$

G_{tablas} (p=0,05; K=5; n=3) = 0,68

Si $G_{exp} < G_{tablas}$, las varianzas de las concentraciones utilizadas son equivalentes, es decir que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados demostrando que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí.

ANOVA

Test de ANOVA : $F_{exp} > F_{tabla}$

Planteamiento de la hipótesis

H_0 : $b = 0$ el modelo lineal NO proporciona un buen ajuste a los datos.

H_1 : $b \neq 0$ el modelo lineal SI proporciona un buen ajuste a los datos.

Criterio de aceptación:

Si $F_{exp} > F_{tablas}$ (4,667) para una probabilidad del 95%, se rechaza la H_0 demostrando que el modelo lineal SI proporciona un buen ajuste a los datos.

Test de Linealidad:

Coeficiente de Variación de los Factores de Respuesta “f” : $\leq 2\%$

Intervalo de Confianza de la Pendiente “b” : No incluye el cero

$$t_{exp} > t_{tabla}$$

Test de Hipótesis para la Pendiente b:

H_0 : "b" es estadísticamente igual a cero.

H_1 : "b" es estadísticamente diferente de cero.

$t_{exp} > t_{tabla} (2,160)$ para $p = 0,05$ y $(n-2)$ grados de libertad, entonces se rechaza la hipótesis nula (H_0) y "b" es significativamente diferente de cero.

Intervalo de Confianza del Intercepto "a" : Incluye el cero

(Test de Proporcionalidad): $t_{exp} < t_{tabla}$

Test de Hipótesis para el Intercepto a:

H_0 : "a" es estadísticamente igual a cero.

H_1 : "a" es estadísticamente diferente de cero.

$t_{exp} < t_{tabla} (2,160)$ para $p=0,05$ y $(n-2)$ grados de libertad, entonces se acepta la hipótesis nula (H_0), concluyendo que "a" es estadísticamente igual a cero.

Linealidad de método

Preparar soluciones de placebo enriquecidos con el principio activo en tres niveles de concentración que cubran el intervalo de trabajo, por pesadas independientes y por triplicado:

80%, 100% y 120% de la concentración nominal de trabajo en rango establecido.

Criterio de aceptación:

Ecuación de la recta : $y = bx + a$

Coeficiente de correlación : Mayor a 0,999

Coeficiente de determinación : Mayor a 0,998

Homogeneidad de varianzas

(Test G de Cochran) : $G_{exp} < G_{tablas}$

Planteamiento de hipótesis para determinar si el factor concentración tiene influencia en los resultados.

H_0 : las varianzas son semejantes.

H_1 : las varianzas son diferentes.

$$G_{exp} = \frac{s_{max}^2}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2}$$

$G_{tablas} (p=0,05; K=3; n=3) = 0,87$

Si $G_{exp} < G_{tablas}$, las varianzas de las concentraciones utilizadas son equivalentes, es decir que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados demostrando que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí.

ANOVA

Test de ANOVA : $F_{exp} > F_{tabla}$

Planteamiento de la hipótesis

H_0 : $b = 0$ el modelo lineal NO proporciona un buen ajuste a los datos.

H_1 : $b \neq 0$ el modelo lineal SI proporciona un buen ajuste a los datos.

Si $F_{exp} > F_{tablas} (5,591)$ para una probabilidad del 95%, se rechaza la H_0 demostrando que el modelo lineal SI proporciona un buen ajuste a los datos.

Test de Linealidad:

Coeficiente de Variación de los Factores de Respuesta "f" : $\leq 2\%$

Intervalo de Confianza de la Pendiente "b" : No incluye el cero

$$t_{exp} > t_{tabla}$$

Test de Hipótesis para la Pendiente b:

H_0 : "b" es estadísticamente igual a cero.

H_1 : "b" es estadísticamente diferente de cero.

$t_{exp} > t_{tabla} (2,365)$ para $p = 0,05$ y $(n-2)$ grados de libertad, entonces se rechaza la hipótesis nula (H_0) y "b" es significativamente diferente de cero.

Intervalo de Confianza del Intercepto "a"

: Incluye el cero

(Test de Proporcionalidad)

$t_{exp} < t_{tabla}$

Test de Hipótesis para el Intercepto a:

H_0 : "a" es estadísticamente igual a cero.

H_1 : "a" es estadísticamente diferente de cero.

$t_{exp} < t_{tabla} (2,365)$ para $p=0,05$ y $(n-2)$ grados de libertad, entonces se acepta la hipótesis nula (H_0), concluyendo que "a" es estadísticamente igual a cero.

EXACTITUD

Para este estudio se trabaja con las mismas muestras preparadas para la determinación de la linealidad del método.

$$\% R = \frac{X_H \times 100}{X_A}$$

Donde:

X_H = Cantidad de analito hallado.

X_A = Cantidad de analito añadido.

Criterio de aceptación:

Promedio de recuperación : 98% - 102%

PRECISIÓN

Repetibilidad instrumental

Para evaluar la precisión instrumental inyectar 6 veces consecutivas una solución del estándar. Determinar la desviación estándar relativa (DSR) de las áreas y de los tiempos de retención obtenidos. La DSR obtenida debe ser menor o igual a 2%.

Repetibilidad del método

Analizar independientemente 6 muestras.

Determinar la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (RSD)

Criterio de aceptación: $RSD \leq 2\%$

Precisión Intermedia

Un segundo analista realizará otro día el análisis del mismo lote empleado en la repetibilidad usando el mismo método analítico y diferente equipo.

Determinar la Desviación Estándar (S) y el Coeficiente de Variación (RSD)

Criterio de aceptación: Coeficiente de variación entre analistas: $\leq 2\%$.

ROBUSTEZ

Estabilidad de la muestra después de 24 horas en refrigeración:

Se consideran las 3 primeras muestras de la repetibilidad como análisis inicial y estas mismas muestras permanezcan 24 horas en refrigeración y se vuelven a correr con un estándar recientemente preparado.

La influencia de este factor se evaluará de la siguiente manera:

Se calcula la desviación estándar relativa $RSD \leq 2\%$ entre los resultados de las muestras trabajadas en las condiciones iniciales y las mismas muestras trabajadas con la nueva condición.

La diferencia absoluta $|d_i|$ entre los resultados de ambas condiciones debe ser: $\leq 2\%$

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

En el desarrollo farmacéutico, la Cromatografía de Líquidos (HPLC) es la técnica más utilizada para determinar el dosaje (cuantificación) y el perfil de impurezas de las sustancias farmacéuticas. Es una técnica versátil con una amplia gama de aplicaciones y es compatible con numerosas técnicas de detección. Esto requirió sistemas cromatográficos mejorados diseñados para dar cabida a las mayores prestaciones de respaldo. El resultado fue una nueva herramienta para el análisis, conocido como Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC). (Chesnut & Salisbury, 2007)

En la búsqueda de un sistema cromatográfico óptimo se obtuvieron los siguientes cromatogramas.

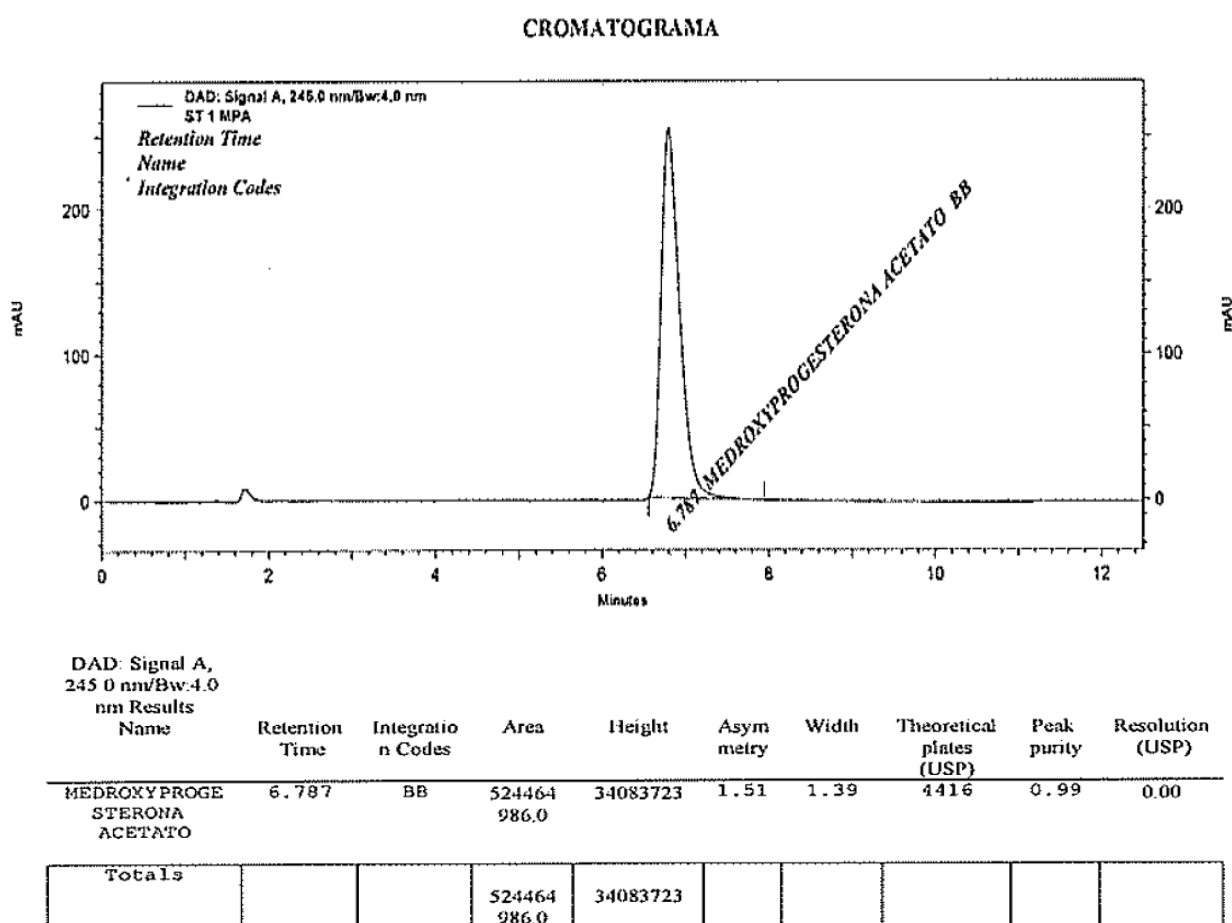
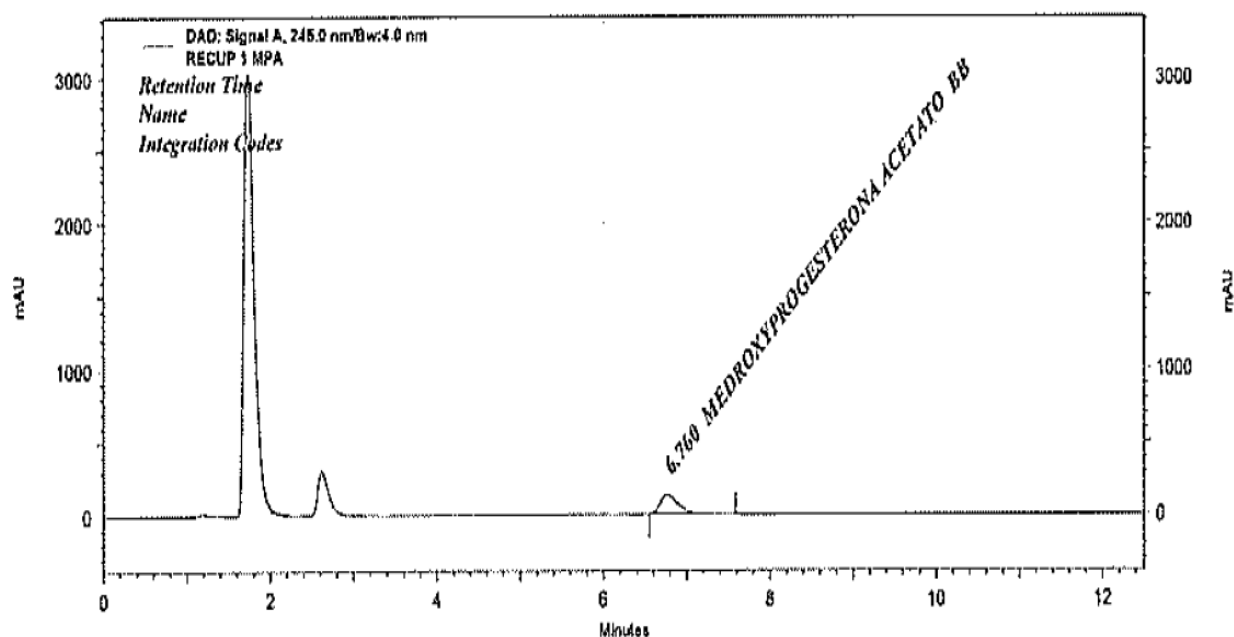


Figura 7. Cromatograma del estándar de medroxiprogesterona acetato para el sistema cromatográfico 1

CROMATOGRAMA

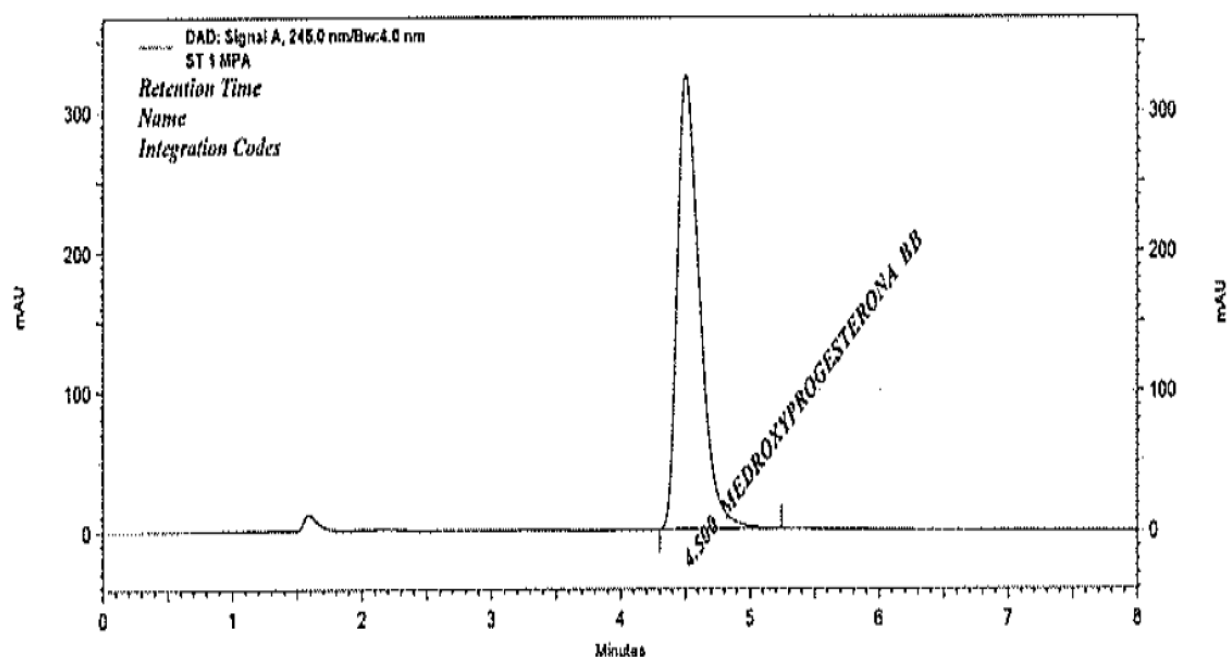


DAD: Signal A,
245.0 nm/Bw:4.0
nm Results

Name	Retention Time	Integration Codes	Area	Height	Asymmetry	Width	Theoretical plates (USP)	Peak purity	Resolution (USP)
MEDROXYPROGESTERONA ACETATO	6.760	BB	268059063.0	17932048	1.50	1.03	4494	0.99	0.00
Totals			268059063.0	17932048					

Figura 8. Cromatograma de medroxiprogesterona acetato en la muestra para el sistema cromatográfico 1

CROMATOGRAMA

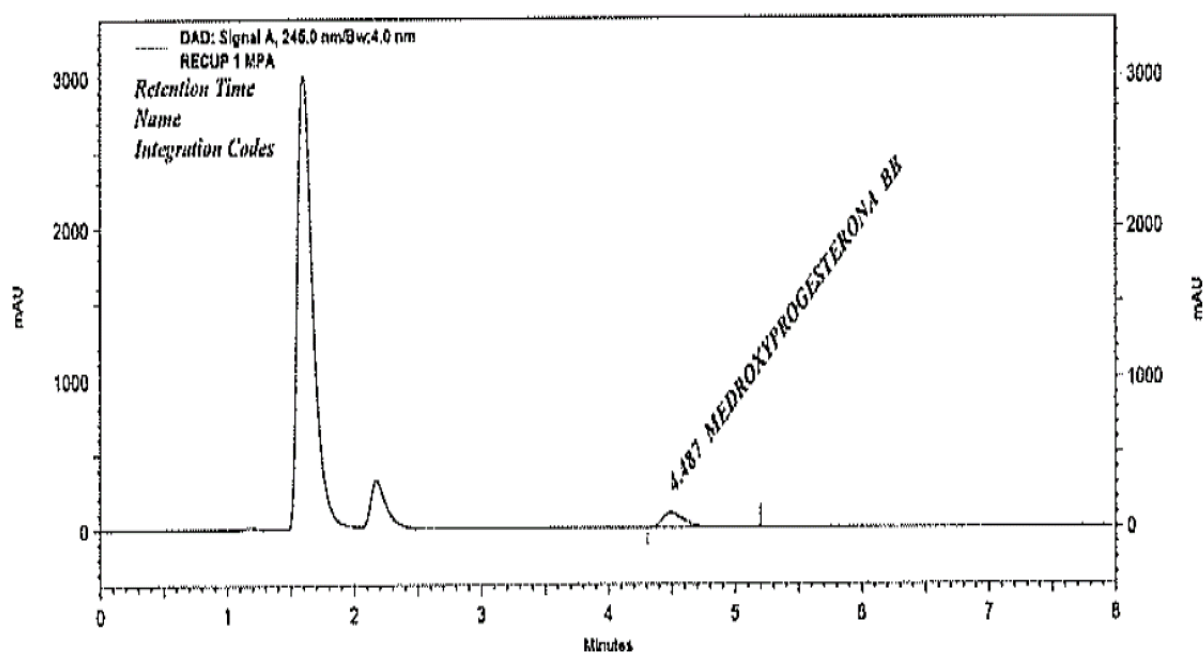


DAD: Signal A,
245.0 nm/Bw:4.0
nm Results

Name	Retention Time	Integration Codes	Area	Height	Asymmetry	Width	Theoretical plates (USP)	Peak purity	Resolution (USP)
MEDROXYPROGESTERONA	4.500	BB	524087 670.0	43618505	1.56	0.95	3233	1.00	0.00
Totals			524087 670.0	43618505					

Figura 9. Cromatograma del estándar de medroxiprogesterona acetato para el sistema cromatográfico 2

CROMATOGRAMA

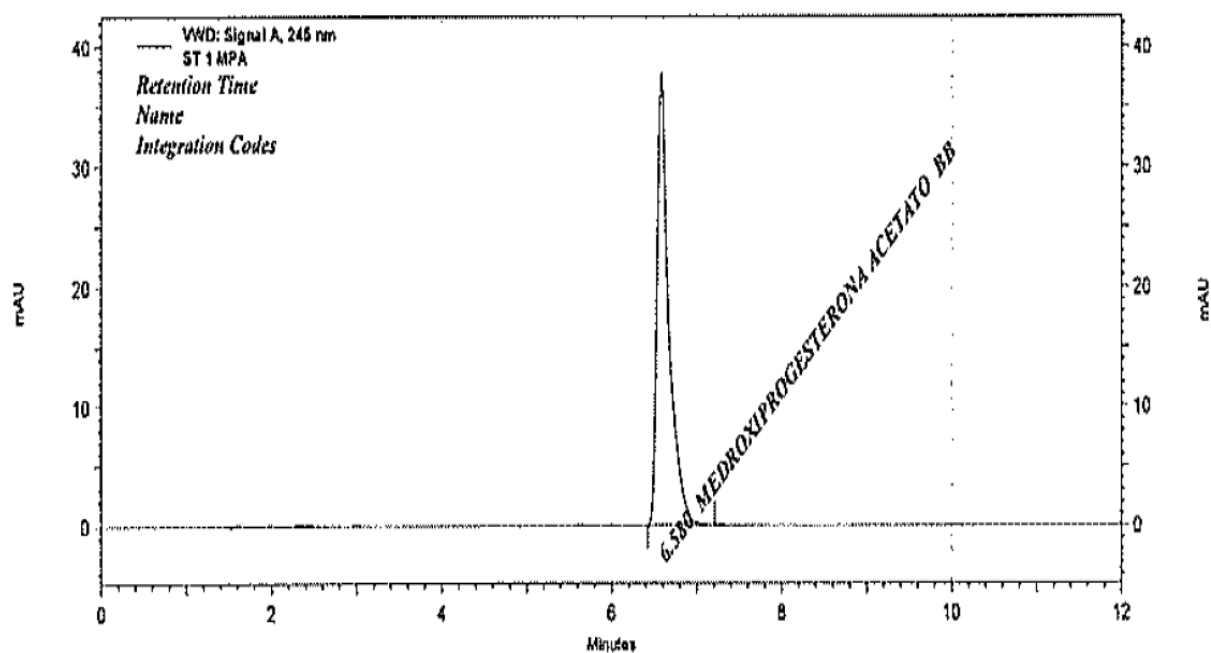


DAD: Signal A,
245.0 nm/Bw:4.0
nm Results

Name	Retention Time	Integration Codes	Area	Height	Asymmetry	Width	Theoretical plates (USP)	Peak purity	Resolution (USP)
MEDROXYPROGESTERONA	4.487	BB	157662 324.0	13314428	1.55	0.89	3253	0.99	0.00
Totals			157662 324.0	13314428					

Figura 10. Cromatograma de medroxiprogesterona acetato en la muestra para el sistema cromatográfico 2

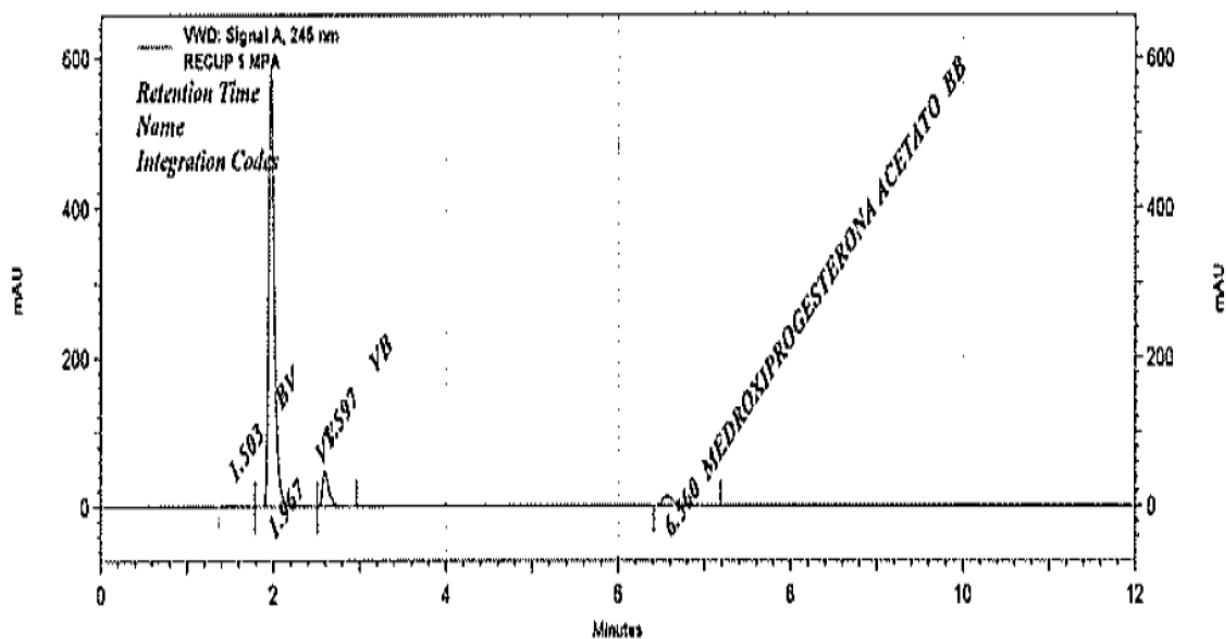
CROMATOGRAMA



VWD: Signal A, 245 nm Results									
Name	Retention Time	Integration Codes	Area	Height	Asymmetry	Width	Theoretical plates (USP)	Peak purity	Resolution (USP)
MEDROXIPROGESTERONA ACETATO	6.580	BB	608639 7.0	632831	1.88	0.79	13451	0.00	0.00
Totals			608639 7.0	632831					

Figura 11. Cromatograma del estándar de medroxiprogesterona acetato para el sistema cromatográfico 3

CROMATOGRAMA

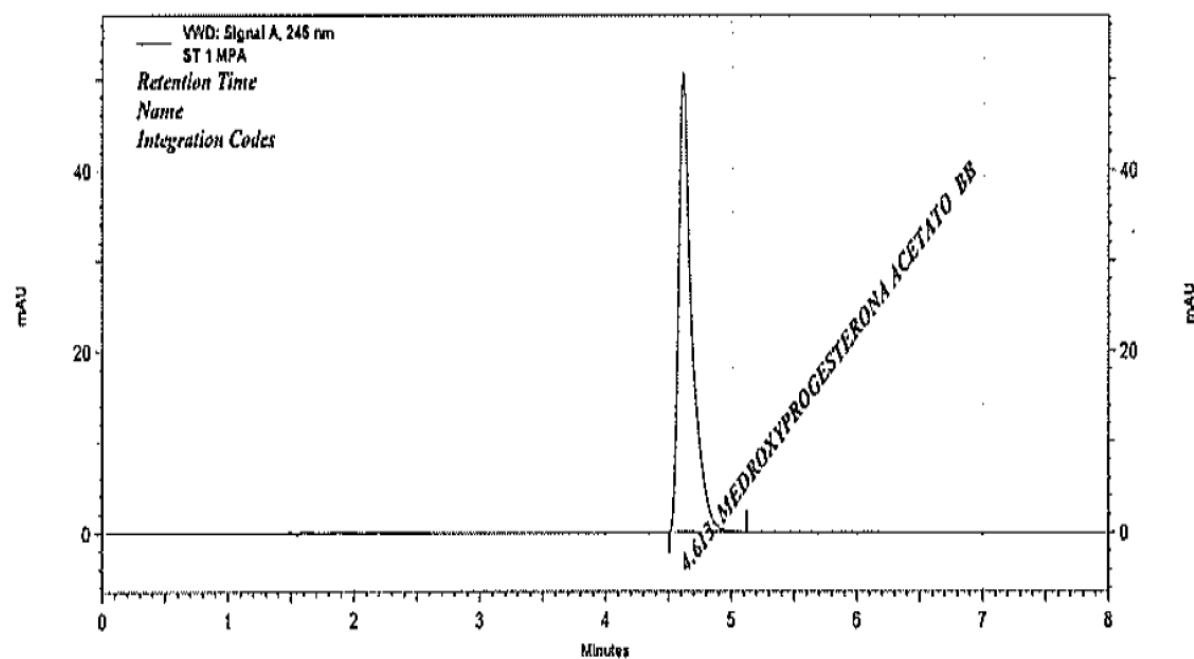


VWD: Signal A,
245 nm Results

Name	Retention Time	Integration Codes	Area	Height	Asymmetry	Width	Theoretical plates (USP)	Peak purity	Resolution (USP)
	1.503	BV	208377.0	42773	1.29	0.42	3967	0.00	0.00
	1.967	VV	44354450.0	9808664	1.57	0.72	4786	0.00	4.43
	2.597	VB	4150580.0	806654	1.66	0.45	6555	0.00	5.21
MEDROXIPROGESTERONA ACETATO	6.560	BB	2070341.0	216054	1.94	0.77	13550	0.00	22.41
Totals			50783748.0	10874145					

Figura 12. Cromatograma de medroxiprogesterona acetato en la muestra para el sistema cromatográfico 3

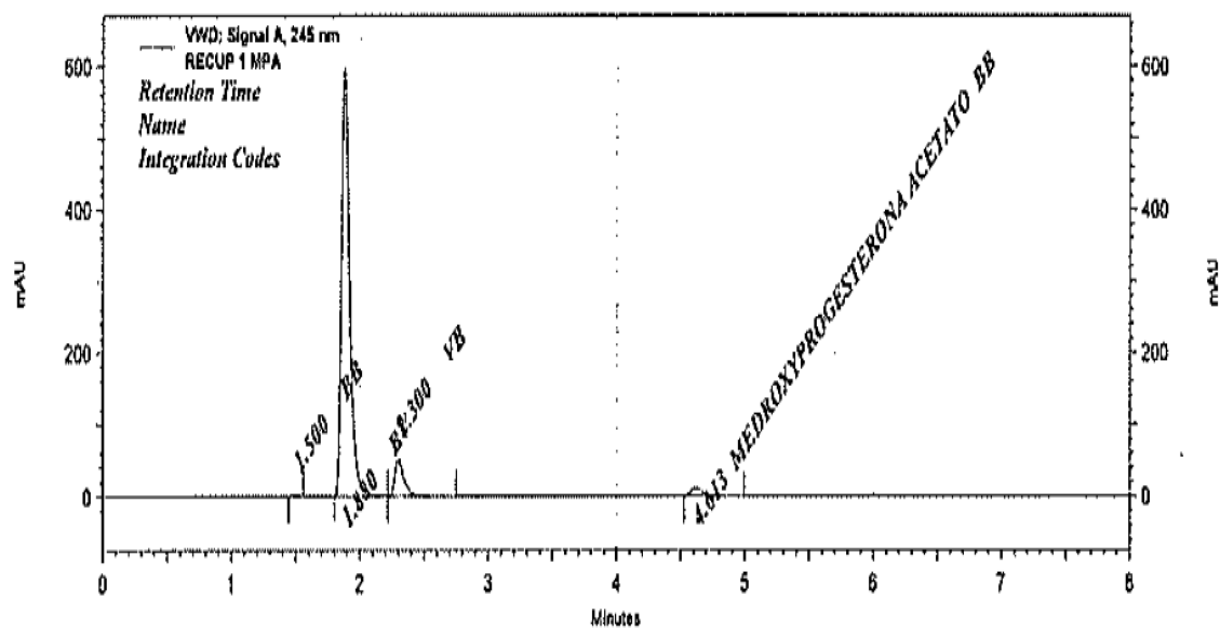
CROMATOGRAMA



VWD: Signal A, 245 nm Results Name	Retention Time	Integratio n Codes	Area	Height	Asym metry	Width	Theoretical plates (USP)	Peak purity	Resolution (USP)
MEDROXYPROGE STERONA ACETATO	4.613	BB	615213 5.0	847555	1.86	0.62	10981	0.00	0.00
Totals			615213 5.0	847555					

Figura 13. Cromatograma del estándar de medroxiprogesterona acetato para el sistema cromatográfico 4

CROMATOGRAMA



VWD: Signal A,
245 nm Results
Name

Retention Time	Integration Codes	Area	Height	Asymmetry	Width	Theoretical plates (USP)	Peak purity	Resolution (USP)
1.500	BB	120983.0	36442	1.02	0.11	4352	0.00	0.00
1.880	BV	43925988.0	10000455	1.52	0.42	4560	0.00	3.76
2.300	VB	4230201.0	857784	1.57	0.53	5547	0.00	3.58
MEDROXYPROGESTERONA ACETATO	BB	1315595.0	186541	1.86	0.47	11686	0.00	15.72
Totals		49592767.0	11081222					

Figura 14. Cromatograma de medroxiprogesterona acetato en la muestra para el sistema cromatográfico 4

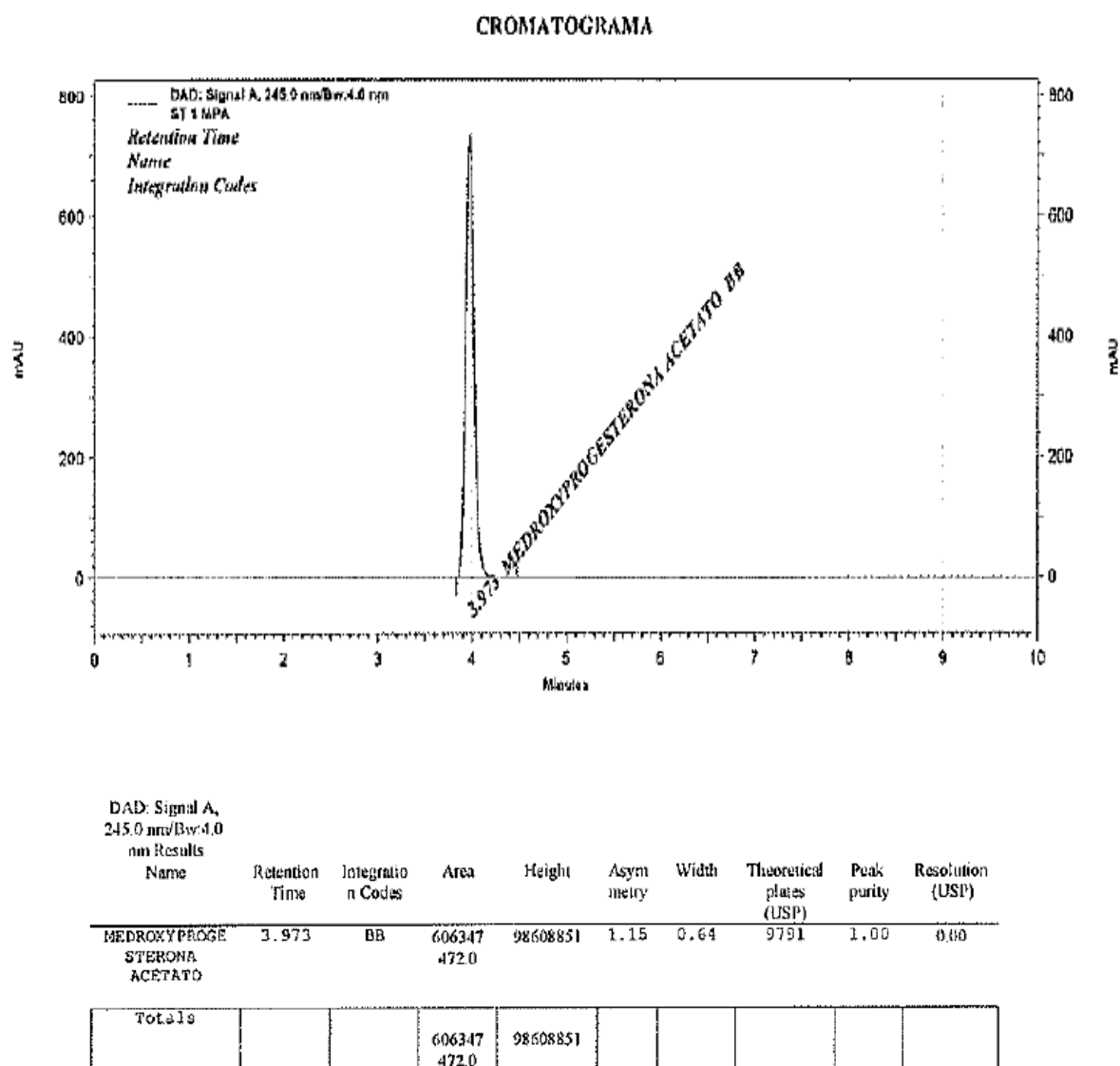
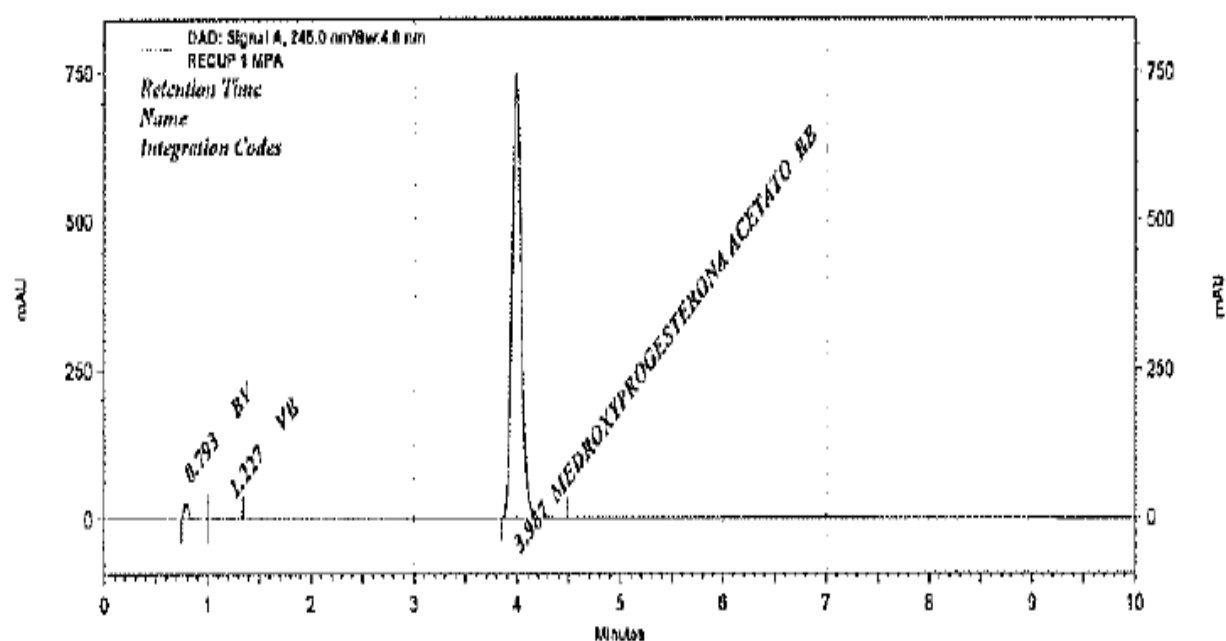


Figura 15. Cromatograma del estándar de medroxiprogesterona acetato para el sistema cromatográfico 5

CROMATOGRAMA

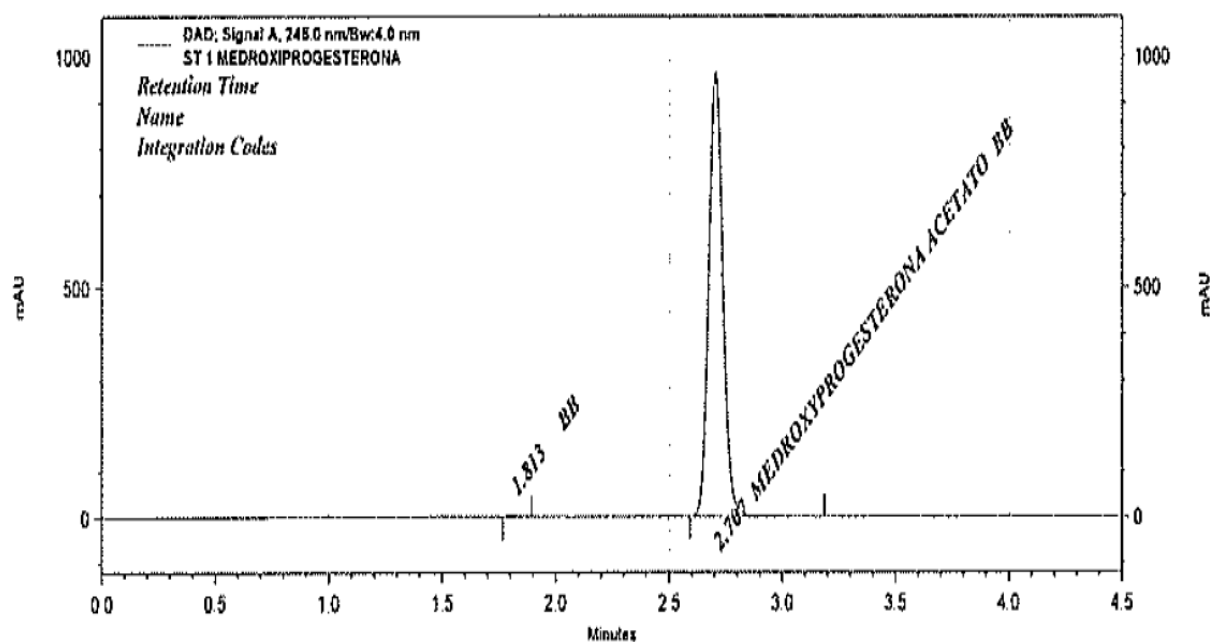


DAD: Signal A,
245.0 nm/Bw:4.0
nm Results

Name	Retention Time	Integration Codes	Area	Height	Asymmetry	Width	Theoretical plates (USP)	Peak purity	Resolution (USP)
	0.793	BV	108147 54.0	3602453	1.19	0.26	1660	0.84	0.00
	1.227	VB	120274 8.0	310772	1.13	0.35	3068	0.48	5.21
MEDROXYPROGESTERONA ACETATO	3.987	BB	612030 149.0	100075793	1.20	0.63	9967	1.00	22.23
Totals			624047 651.0	103989018					

Figura 16. Cromatograma de medroxiprogesterona acetato en la muestra para el sistema cromatográfico 5

CROMATOGRAMA

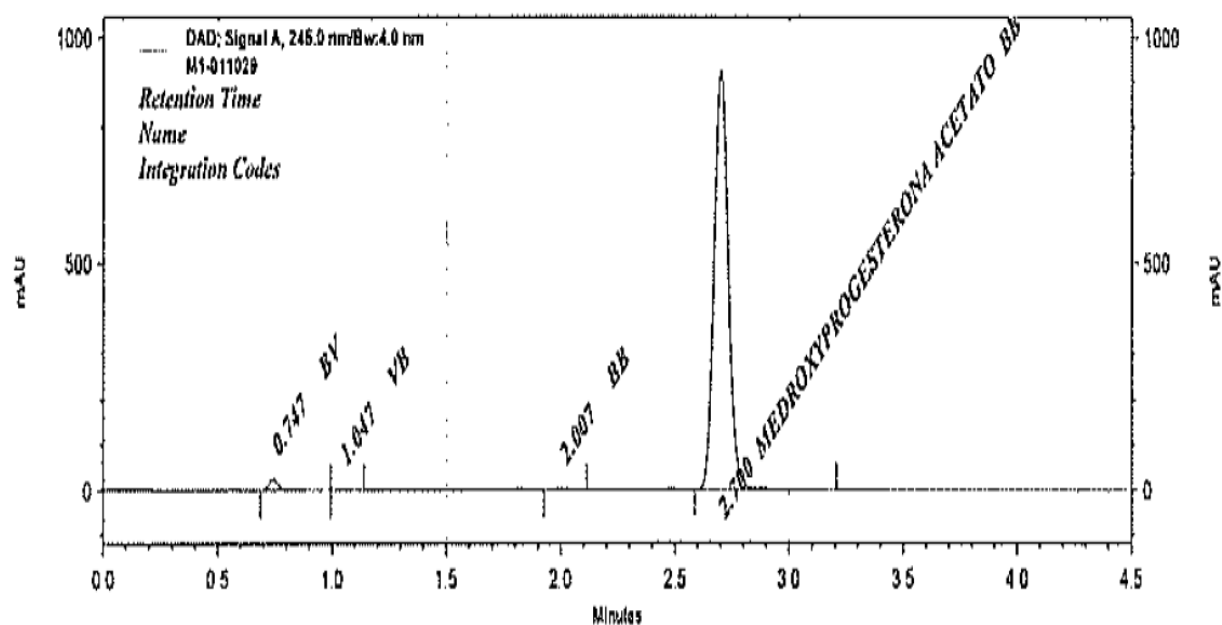


DAD: Signal A,
245.0 nm/Bw:4.0
nm Results

Name	Retention Time	Integration Codes	Area	Height	Asymmetry	Width	Theoretical plates (USP)	Peak purity	Resolution (USP)
	1.813	BB	771086.0	243658	1.12	0.13	7108	0.47	0.00
MEDROXYPROGESTERONA ACETATO	2.707	BB	561051.75.0	129624513	1.08	0.59	9002	1.00	8.93
Totals			561822.261.0	129868171					

Figura 17. Cromatograma del estándar de medroxiprogesterona acetato para el sistema cromatográfico 6

CROMATOGRAMA

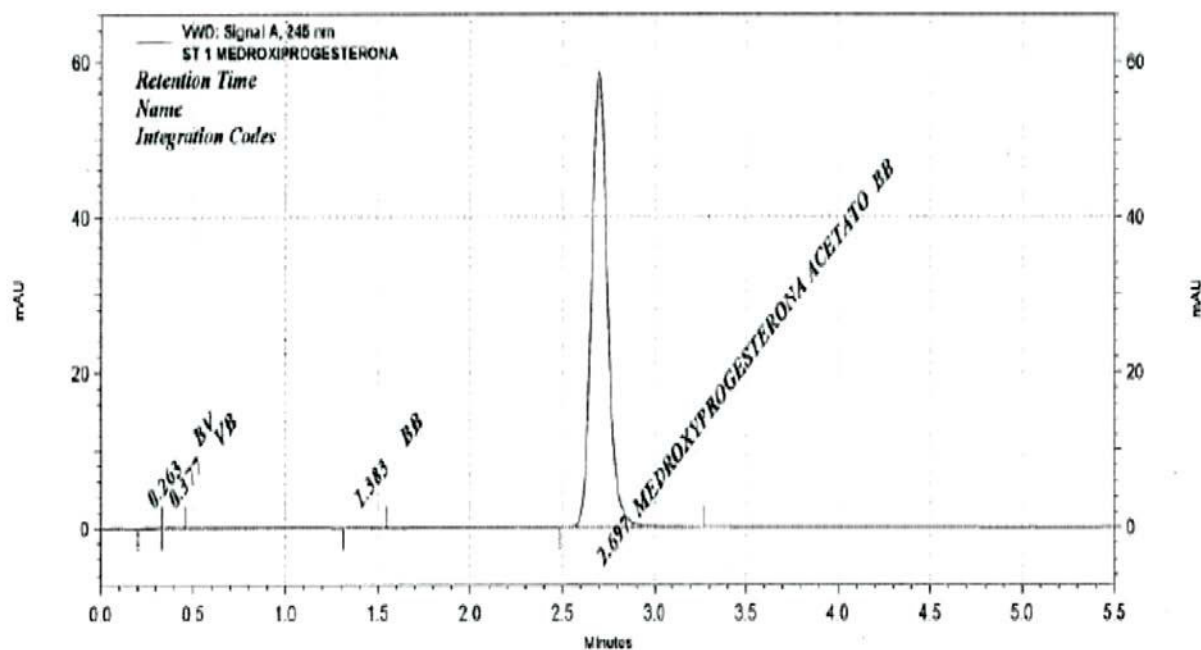


DAD: Signal A,
245.0 nm/Bw:4.0
nm Results

Name	Retention Time	Integration Codes	Area	Height	Asymmetry	Width	Theoretical plates (USP)	Peak purity	Resolution (USP)
	0.747	BV	902097	3010970	1.15	0.31	1608	0.89	0.00
	1.047	VB	857743.0	290293	1.10	0.15	2832	0.14	3.92
	2.007	BB	854520.0	233204	1.07	0.19	6838	0.43	10.92
MEDROXYPROGESTERONA ACETATO	2.700	BB	535921986.0	124502457	1.11	0.62	9051	1.00	6.58
Totals			546655221.0	128036924					

Figura 18. Cromatograma de medroxiprogesterona acetato en la muestra para el sistema cromatográfico 6

CROMATOGRAMA



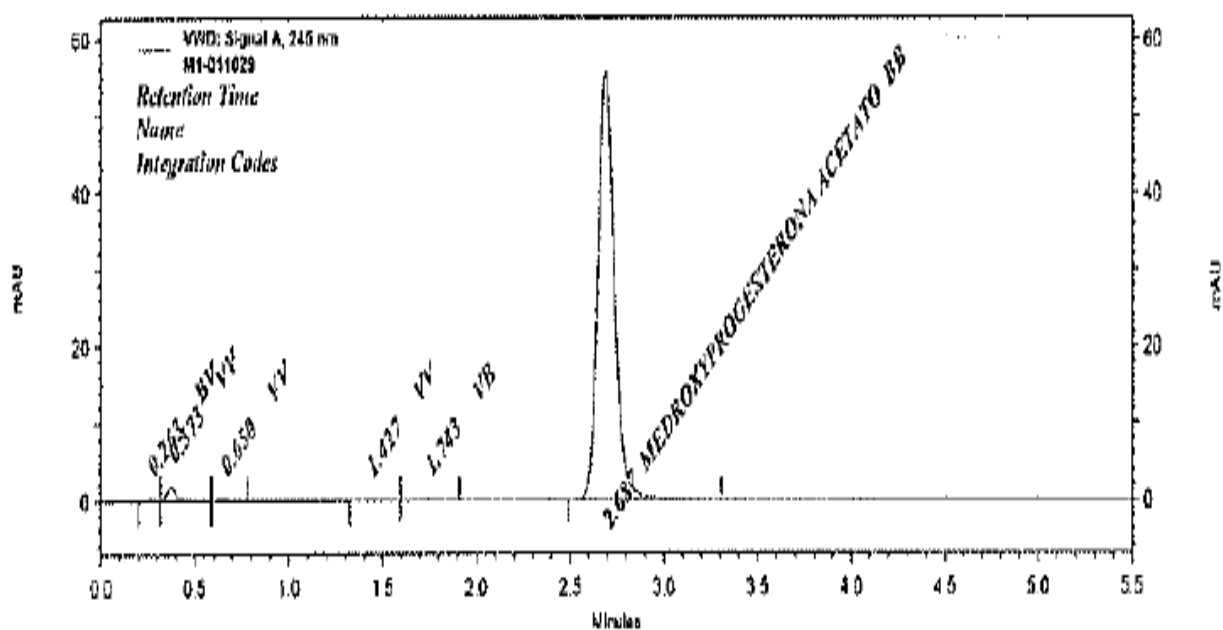
VWD: Signal A,
245 nm Results

Name	Retention Time	Integration Codes	Area	Height	Asymmetry	Width	Theoretical plates (USP)	Peak purity	Resolution (USP)
MEDROXYPROGESTERONA ACETATO	0.263	BV	9868.0	2285	0.00	0.13	68	0.00	0.00
	0.377	VB	10133.0	2367	0.00	0.12	178	0.00	0.94
	1.383	BB	11532.0	2011	1.56	0.23	1209	0.00	7.40
	2.697	BB	597588.9	984972	1.17	0.78	4724	0.00	8.31

Totals			600742.0	991635					
--------	--	--	----------	--------	--	--	--	--	--

Figura 19. Cromatograma del estándar de medroxiprogesterona acetato para el sistema cromatográfico 7

CROMATOGRAMA



VWD: Signal A, 245 nm Results									
Name	Retention Time	Integration Codes	Area	Height	Asymmetry	Width	Theoretical plates (USP)	Peak purity	Resolution (USP)
MEDROXYPROGESTERONA ACETATO	0.263	BV	9161.0	2335	0.00	0.12	78	0.00	0.00
	0.373	VV	105692.0	30707	1.38	0.27	327	0.00	1.09
	0.650	VV	11600.0	2871	0.00	0.19	751	0.00	3.12
	1.427	VV	12244.0	1677	0.00	0.27	1007	0.00	5.65
	1.743	VB	10227.0	2014	0.00	0.31	3273	0.00	2.10
	2.687	BB	565837.50	934509	1.21	0.82	4720	0.00	6.78
Totals			580729.90	974113					

Figura 20. Cromatograma de medroxiprogesterona acetato en la muestra para el sistema cromatográfico 7

VALIDACION DEL MÉTODO ESPECÍFICO – UHPLC

Se procede a validar el sistema cromatográfico 7 por ser el sistema con menor tiempo, buena asimetría y platos teóricos.

ESPECIFICIDAD

En el cromatograma de la solución diluyente y placebo no se observa señal en el tiempo de retención de la medroxiprogesterona acetato obtenido en la solución estándar y muestra cómo se aprecia en las figuras 22, 23, 24 y 25.

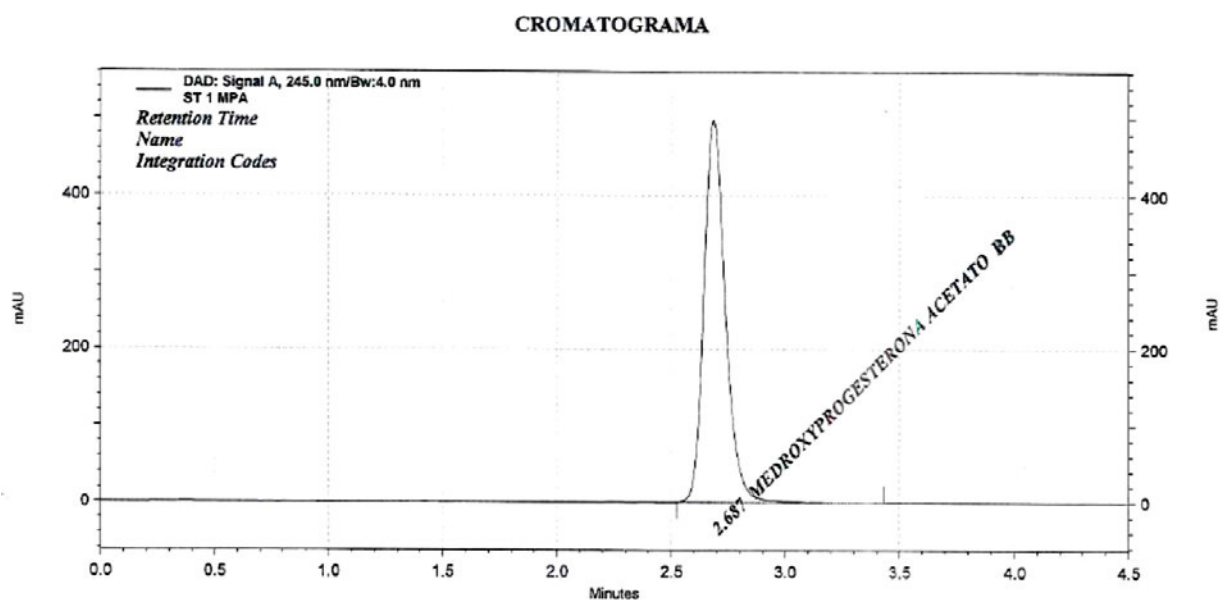


Figura 21. Cromatograma de la solución estándar

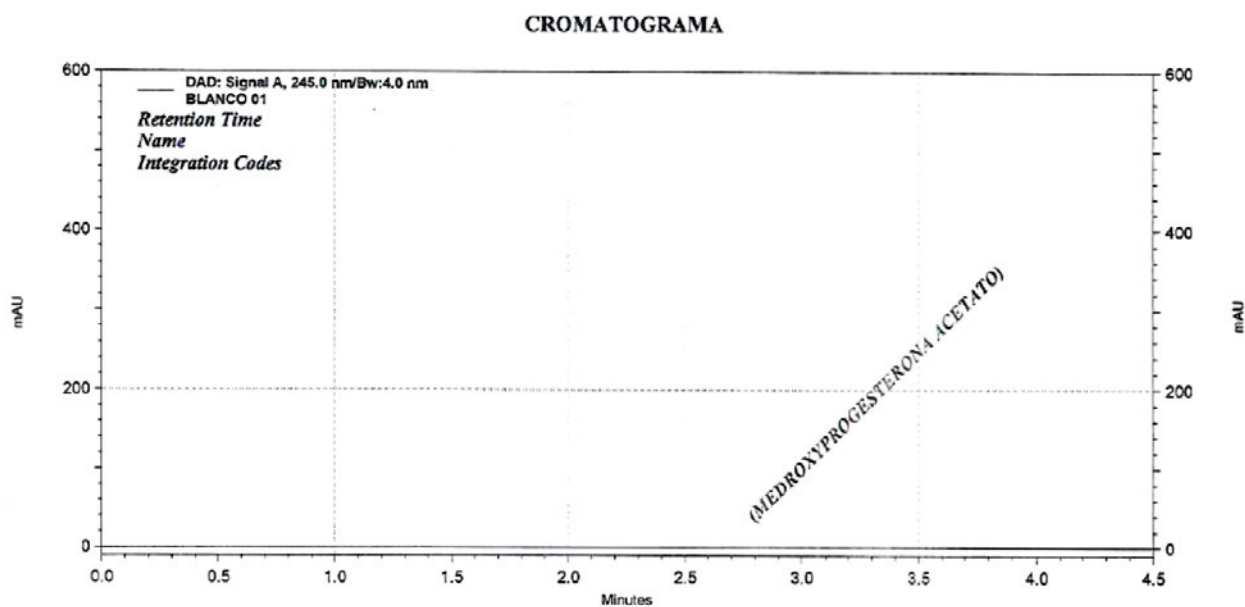


Figura 22. Cromatograma de la solución diluyente (Blanco)

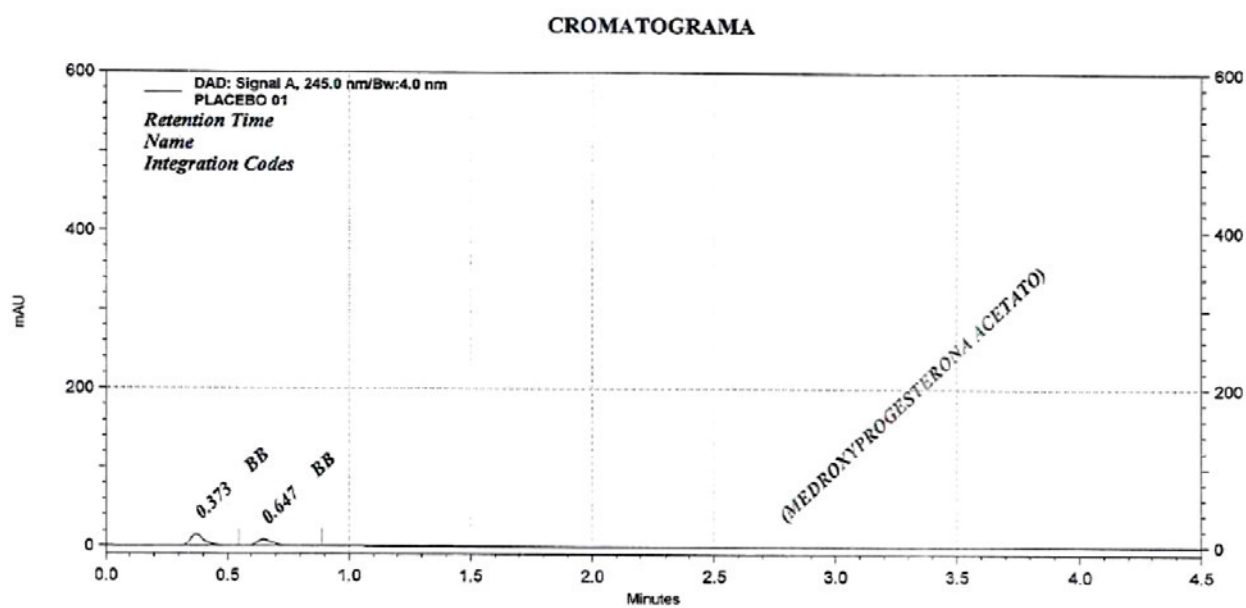


Figura 23. Cromatograma del placebo

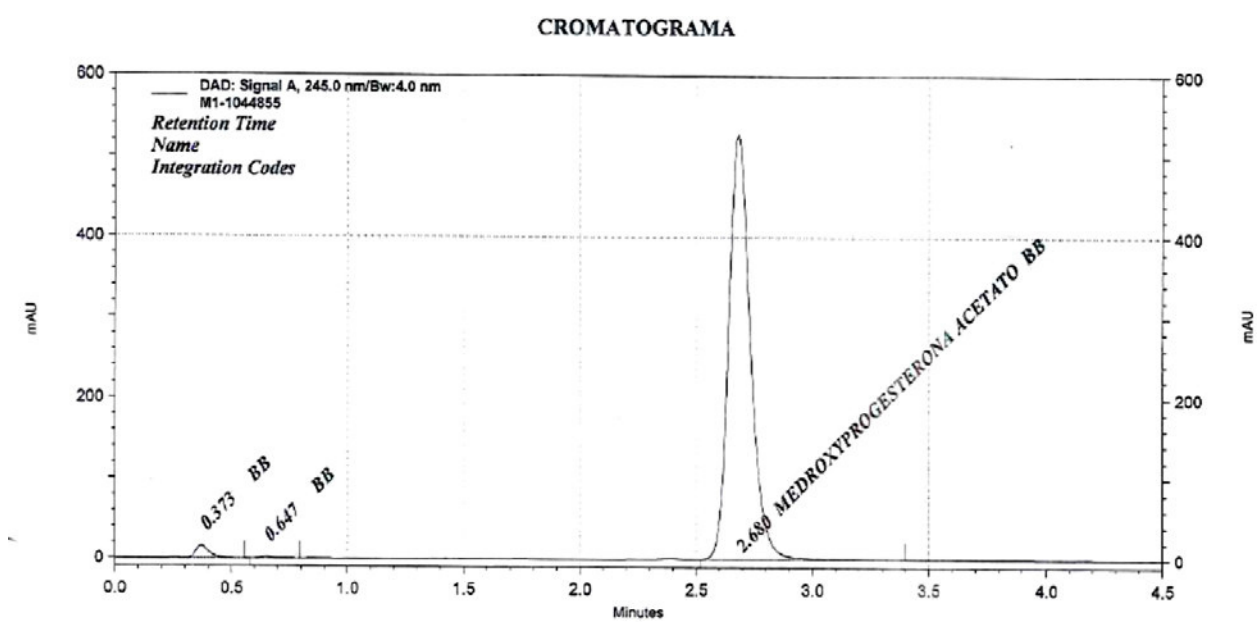


Figura 24. Cromatograma de medroxiprogesterona acetato en una muestra

LINEALIDAD

LINEALIDAD DE SISTEMA

Tabla 6. Linealidad de Sistema de Medroxiprogesterona acetato.

Conc. (%)	Dato (n)	x (mg/mL)	y	f (y/x)	Varianza (s ²)
50	1	0,0593	215131914,5	3627768811,3	278771919793880,0
	2	0,0596	218143339,5	3658983704,1	
	3	0,0598	218404642,0	3653649456,5	
75	1	0,0890	321370101,0	3612842015,3	252030891310863,0
	2	0,0894	324903689,0	3633138058,6	
	3	0,0897	326753919,5	3644135855,5	
100	1	0,1186	429781603,0	3623702923,6	382807568518020,0
	2	0,1192	433863054,0	3638657609,3	
	3	0,1196	437866955,5	3662496248,6	
125	1	0,1483	539453814,0	3638723201,3	626814737181460,0
	2	0,1490	549159596,0	3684487488,5	
	3	0,1494	549830352,5	3679202694,9	
150	1	0,1779	649002666,5	3648043321,8	470209065267959,0
	2	0,1789	660071598,0	3690526339,4	
	3	0,1793	659372023,5	3676836128,9	
SUMA	15				2010634182072180,0

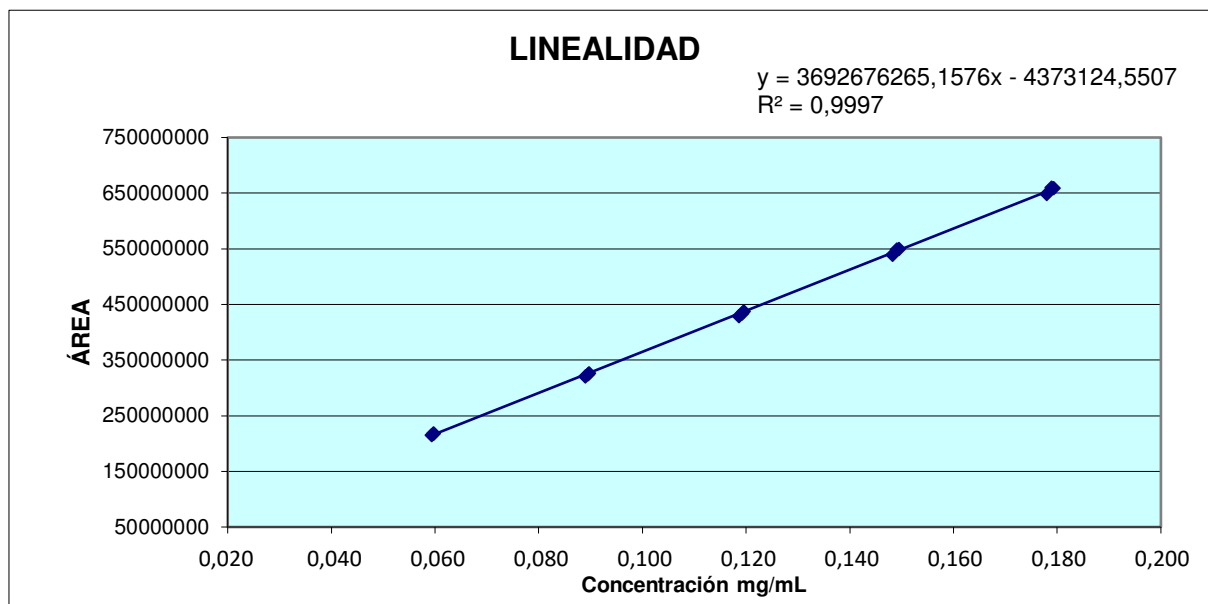


Figura 25. Representación gráfica de la recta de regresión

Coeficiente de correlación (r) y Coeficiente de determinación (r^2)

Valor de coeficiente de correlación (r) : 0,9999

Valor de coeficiente de regresión lineal (r^2) : 0,9997

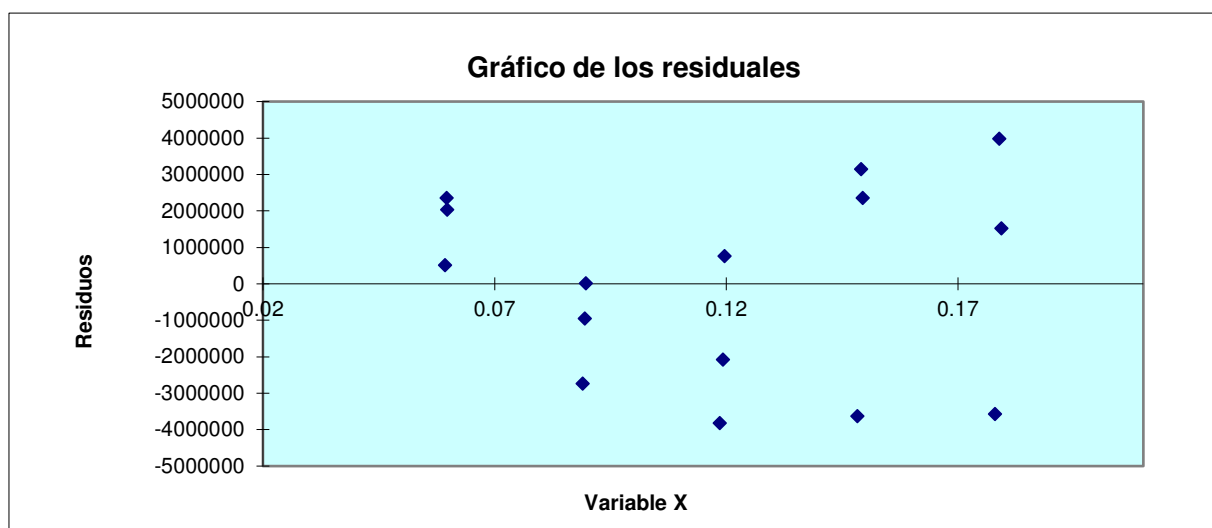


Figura 26. Varianza Residual Constante (Homoscedasticidad)

Análisis de la varianza: ANOVA

Homogeneidad de varianzas (Test G de Cochran)

$$G_{\text{exp}} = \frac{s^2_{\text{max}}}{s^2_1 + s^2_2 + s^2_3} = 0,31$$

$$G_{\text{tablas}} (p=0,05; K=5; n=3) = 0,68$$

Dado que $G_{\text{exp}} < G_{\text{tablas}}$, las varianzas de las concentraciones utilizadas son equivalentes, es decir que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados demostrando que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí.

ANOVA

$$F_{\text{exp}} = 48451,343$$

$$F_{\text{tabla}} = 4,667$$

Como $F_{\text{exp}} > F_{\text{tablas}}$, no se acepta la H_0 ; el modelo lineal SI proporciona un buen ajuste a los datos.

Test de Linealidad

Coeficiente de Variación de los Factores de Respuesta (f) :

$$f = \frac{y}{x}$$

$$\text{Media de } f = 3651546257,2$$

$$\text{DSR} = 0,64\%$$

Intervalo de Confianza de la Pendiente "b"

$$t_{\text{exp}} = 220,117$$

$$t_{\text{tabla}} = 2,160$$

$t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$ para $p = 0,05$ y $(n-2)$ grados de libertad, entonces se rechaza la hipótesis nula (H_0) y "b" es significativamente diferente de cero.

Test de Proporcionalidad.

$$t_{\text{exp}} = 2,063$$

$$t_{\text{tabla}} = 2,160$$

$t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$ para $p=0,05$ y $(n-2)$ grados de libertad, entonces se acepta la hipótesis nula (H_0), concluyendo que "a" es estadísticamente igual a cero.

LINEALIDAD DE MÉTODO

Tabla 7. Linealidad de método de medroxiprogesterona acetato

Conc. (%)	Dato (n)	x (mg/mL)	y	f (y/x)	Varianza (s ²)
80	1	0,0967	354200622,0	3662063303,3	76345686408701,2
	2	0,0964	352891339,0	3660528421,5	
	3	0,0958	352086966,0	3676371344,6	
100	1	0,1186	434366829,5	3662363253,7	240916257795353,0
	2	0,1180	433600827,5	3675560110,7	
	3	0,1186	438035474,0	3693295424,2	
120	1	0,1433	531877872,5	3710648829,6	339085833907161,0
	2	0,1430	525488467,5	3674201876,6	
	3	0,1437	529778817,5	3687845810,3	
SUMA	9				656347778111216,0

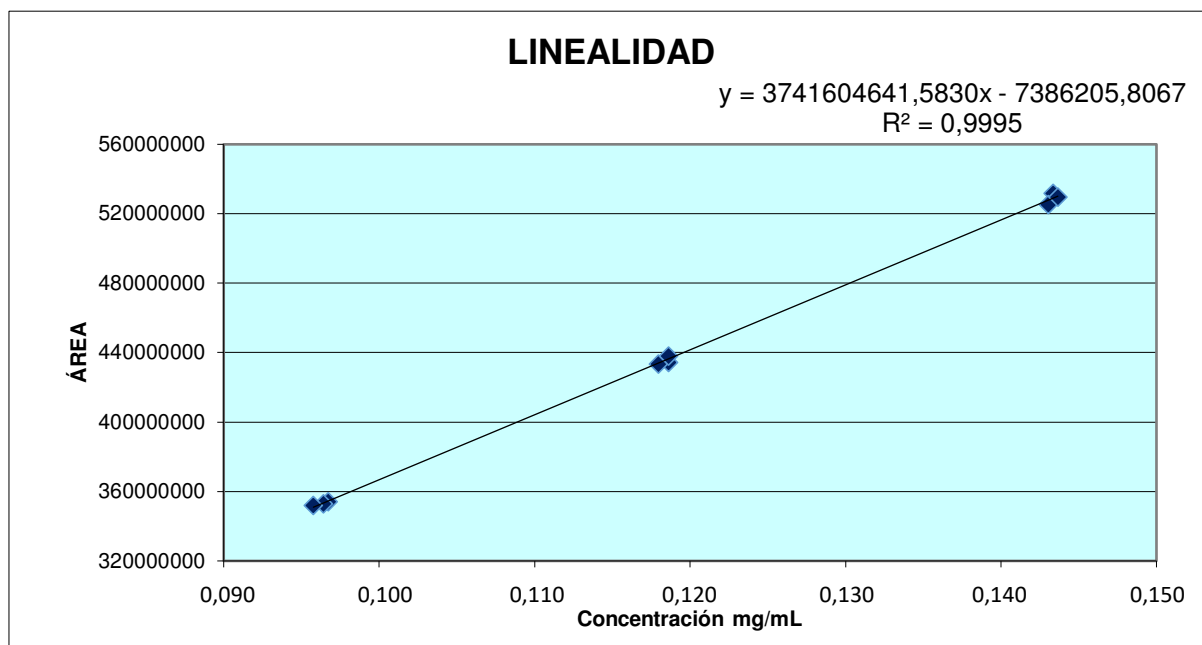


Figura 27. Representación gráfica de la recta de regresión

Coeficiente de correlación (r) y Coeficiente de Determinación (r^2)

Valor de coeficiente de correlación (r) : 0,9998

Valor de coeficiente de regresión lineal (r^2) : 0,9995

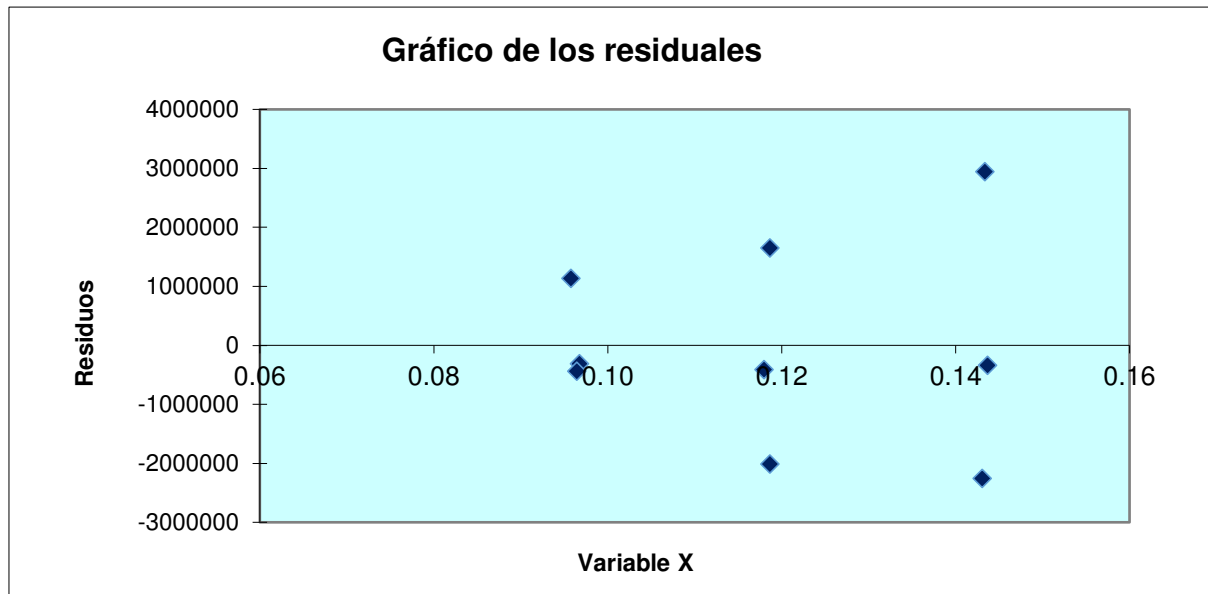


Figura 28. Varianza Residual Constante (Homoscedasticidad)

Análisis de la Varianza: ANOVA.

Homogeneidad de varianzas (Test G de Cochran)

$$G_{\text{exp}} = \frac{s^2_{\text{max}}}{s^2_1 + s^2_2 + s^2_3} = 0,52$$

$$G_{\text{tablas}} (p=0,05; K=3; n=3) = 0,87$$

Dado que $G_{\text{exp}} < G_{\text{tablas}}$, las varianzas de las concentraciones utilizadas son equivalentes, es decir que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados demostrando que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí.

ANOVA

$$F_{\text{exp}} = 14527,8184$$

$$F_{\text{tabla}} = 5,591$$

Como $F_{\text{exp}} > F_{\text{tablas}}$, no se acepta la H_0 ; el modelo lineal SI proporciona un buen ajuste a los datos.

Test de Linealidad

Coeficiente de Variación de los factores de respuesta (f)

$$f = \frac{y}{x}$$

Media de f = 3678097597,2

DSR = 0,45%

Intervalo de Confianza de la pendiente b

$$t_{exp} = 120,531$$

$$t_{tabla} = 2,365$$

$t_{exp} > t_{tabla}$ para $p = 0,05$ y $(n-2)$ grados de libertad, entonces se rechaza la hipótesis nula (H_0) y "b" es significativamente diferente de cero.

Test de Proporcionalidad.

$$t_{exp} = 1,968$$

$$t_{tabla} = 2,365$$

$t_{exp} < t_{tabla}$ para $p=0,05$ y $(n-2)$ grados de libertad, entonces se acepta la hipótesis nula (H_0), concluyendo que "a" es estadísticamente igual a cero.

EXACTITUD

Tabla 8. Resultado de exactitud

Conc. (%)	Ensayo	Añadido (mg)	Hallado (mg)	Recuperación %
80	1	30,5	30,37	99,56
	2	30,4	30,25	99,52
	3	30,2	30,18	99,95
100	1	37,4	37,24	99,57
	2	37,2	37,17	99,92
	3	37,4	37,55	100,41
120	1	45,2	45,60	100,88
	2	45,1	45,05	99,89
	3	45,3	45,42	100,26

n : 9
 Porcentaje de recuperación : 99,99 %
 Desviación estándar relativa : 0,45 %

PRECISIÓN

REPETIBILIDAD

Tabla 9. Resultados de repetibilidad

Muestra Nº	mg/mL hallados	%
1	156,39	104,26
2	154,70	103,13
3	156,89	104,60
4	158,12	105,41
5	159,98	106,65
6	155,95	103,97

Media : 104,67 %
 RSD : 1,17 %

Límites de Confianza

Intervalo de Confianza del 95% Individual = $X \pm t_{\text{tabla}} \cdot S$
 104,67 ± 3,15

Intervalo de Confianza del 95% de la media = $\frac{X \pm t_{\text{tabla}} \cdot S}{\sqrt{n}}$
 104,67 ± 1,28

PRECISION INTERMEDIA

Tabla 10. Resultado de precisión intermedia

Nº de Muestra	Analista 1	Analista 2
1	104,26	103,00
2	103,13	103,11
3	104,60	103,04
4	105,41	103,35
5	106,65	103,82
6	103,97	103,56

Número de Datos : 12
 Media : 103,9 %
 RSD : 1,07 %

ROBUSTEZ

Tabla 11. Resultados de muestra después de 24 horas en refrigeración

Muestra	Porcentaje		Diferencia
	Inicio	Final	
M1	104,26	103,67	0,59
M2	103,13	102,54	0,59
M3	104,60	104,63	0,03
PROMEDIO	104,00	103,61	0,41%
	y ₀	y ₁	 d₁
RSD	0.81%		

Tabla 12. Cuadro comparativo de dos métodos analíticos para la cuantificación de Medroxiprogesterona acetato en un producto inyectable

	Método USP	Método UHPLC
Lote 1	156,30 mg/mL	156,37 mg/mL
	104,2%	104,2%
Lote 2	158,15 mg/mL	156,30 mg/mL
	105,4%	104,2%

Tabla 13. Tiempo de uso del Cromatógrafo para el análisis de un lote de producto.

Ensayo: Dosaje	Método USP (h)	UHPLC (h)
Horas Maquina	5,0	1,0

Tabla 14. Tiempo de análisis de un lote de producto

Ensayo: Dosaje	Método USP (h)	UHPLC (h)
Horas Hombre	5,0	2,0

Tabla 15. Porcentaje de reducción del Tiempo de análisis de un lote de producto

Reducción Horas Hombre	Reducción Horas Maquina
3,0 h = 60 %	4,0 h = 80 %

Tabla 16. Cuadro Comparativo de Costo que involucra el análisis de producto.

	Método USP	UHPLC
Reactivos/Insumos	S/. 2 329,51	S/. 1 834,66
HH	S/. 72,92	S/. 29,17
Total	S/. 2 402,43	S/. 1 863,83
Reducción	S/. 538,6 (22%)	

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Este estudio experimental tuvo como objetivo desarrollar un método rápido y confiable para la cuantificación de medroxiprogesterona acetato suspensión inyectable con el fin de obtener resultados más rápidos y disminuir el uso de reactivos que perjudican el medio ambiente para un producto que se fabrica una cantidad mayor de 100 Lotes al año, si el producto se analiza por el método indicado en la farmacopea USP 37 la cantidad de reactivos como cloroformo, hexano y cloruro de butilo empleado sería considerable.

Debido al reciente empleo de equipos UHPLC en Medifarma S.A. con una tecnología que permiten soportar una alta presión y con el surgimiento de nuevas columnas que soportan presiones elevadas se está en la búsqueda de reducir tiempos de análisis y reducir costos en compra de reactivos y columnas cromatográficas; en vista de que no se cuenta con metodología para la cuantificación por estos equipos se busca sistemas cromatográficos por HPLC como las empleadas por Das Gupta; Cavina & colaboradores; Segall & colaboradores y Rambaud & colaboradores quienes determinaron medroxiprogesterona acetato en preparaciones farmacéuticas y biológicas, para luego hacer la migración a UHPLC (Das Gupta, 1982) (Cavina, Valvo, & Alimenti, 1985) (Segall, Hormaechea, Vitale, Perez, & Pizzorno, 1999) (Rambaud, Bichon, Cesbron, Le Bizec, & Andre, 2005).

Se evaluó 7 sistemas cromatográficos, para el Sistema cromatográfico 1 y 2 se empleó una columna marca Phenomenex modelo Synergi con una fase móvil conteniendo un buffer acetato 10 mM pH 5,0 y metanol variando ligeramente el volumen de inyección y flujo, manteniendo la temperatura constante, siendo los tiempos de retención de 6,8 y 4,5 minutos respectivamente; para el Sistema cromatográfico 3 y 4 se empleó una marca de columna Agilent modelo Zorbax SB C18 a flujo y volumen de inyección similar, variando ligeramente la proporción de fase móvil conteniendo Buffer acetato 10 mM pH 5,0 y metanol manteniendo la temperatura constante siendo los tiempos de retención de 6,6 y 4,6 minutos respectivamente; para el sistema cromatográfico 5 y 6 se empleó una marca de columna Phenomenex modelo Kinetex XB-C18 a flujo y temperatura constante

variando ligeramente el volumen de inyección y la proporción de fase móvil conteniendo Buffer acetato 20 mM pH 5,0 y metanol siendo los tiempos de retención de 4.0 y 2.7 minutos; para el Sistema cromatográfico 7 se empleó una marca de columna Phenomenex modelo Kinetex de menor dimensión que la empleada en el sistema cromatográfico 5 y 6 manteniendo constante la temperatura y variando significativamente el flujo y el volumen de inyección, siendo el tiempo de retención de 2.7 minutos; tanto el sistema cromatográfico 6 y 7 poseen el mismo tiempo de retención siendo la variación en el flujo de 1,2 mL/min a 0,5 mL/min y volumen de inyección de 3µL a 1µL por lo que el sistema cromatográfico 7 tiene un tiempo de retención corto y un consumo de fase móvil menor con respecto al sistema cromatográfico 6. Después de elegir el mejor sistema cromatográfico y validar el método por UHPLC se realizó la comparación para demostrar que no existe diferencia en los resultados obtenidos tanto por el método tradicional (USP) como con este nuevo método por cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UHPLC). En los resultados que se presentan en la Tabla 12, se aprecia que no existe variación significativa entre los resultados obtenidos por ambos métodos ($\pm 2\%$).

Del mismo modo se evaluó si existe disminución en tiempo de análisis encontrando una disminución del 60% de las horas hombre (3 horas) y 80% de las horas máquina (4 horas) para el análisis de un lote de medroxiprogesterona acetato suspensión inyectable indicado en las Tablas 13, 14 y 15; así como el costo de análisis encontrando una disminución del 22% en relación al método tradicional (USP) empleado en cuantificación de medroxiprogesterona acetato suspensión inyectable calculado en base a la cantidad de reactivos que se presentan en la tabla 5, insumos (membrana de filtración, Columna cromatográfica) y horas hombre empleados para el análisis de un Lote indicado en la tabla 16.

CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método analítico evaluando diferentes sistemas cromatográficos, siendo el más adecuado el Sistema cromatográfico 7 el cual se validó para cuantificar medroxiprogesterona acetato en una suspensión inyectable por Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución (UHPLC) bajo las recomendaciones establecidas en la farmacopea USP, ICH Q2 (R1), publicaciones científicas y procedimientos internos de laboratorio.
- Al evaluar el método analítico según USP 37 y el método por Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución (UHPLC) no se encontró variación significativa en dos lotes evaluados.
- Fue posible implementar un método analítico confiable utilizando Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución (UHPLC) permitiendo la reducción de horas hombre en un 60%, horas máquina en un 80% y disminución de costos en 22% así como el cuidado del medio ambiente debido al ahorro en disolventes orgánicos utilizados convencionalmente en el análisis.
- La validación realizada para el método analítico por Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución (UHPLC) empleado para la cuantificación de medroxiprogesterona acetato que resultó ser específico, y no presenta interferencia de excipientes cumpliendo con los parámetros de validación, por tanto, el método es adecuado para su uso en el análisis del producto.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Alfonso R, G. (2000). *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (Vol. II). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Brunton, L., Chabner, B., & Knollmann, B. (2012). *Godman & Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Mexico D.F.: MCGRAW HILL INTERAMERICANA EDITORES S.A.
- Burana-osot, J., Ungboriboonpisal, S., & Sriphong, L. (2006). A stability-indicating HPLC method for medroxyprogesterone acetate in bulk drug and injection formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40(5), 1068 - 72. doi:10.1016/j.jpba.2005.08.028
- Cavina, G., Valvo, L., & Alimenti, R. (1985). Quantitative analysis and purity evaluation of medroxyprogesterone acetate by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 3(6), 536 - 46. doi:10.1016/0731-7085(85)80071-6
- Chesnut, S., & Salisbury, J. (2007). The role of UHPLC in pharmaceutical development. *Journal of Separation Science*, 30(8), 1183 - 90. doi:10.1002/jssc.200600505
- Das Gupta, V. (1982). Quantitation of hydroxyprogesterone caproate, medroxyprogesterone acetate, and progesterone by reversed-phase high-pressure liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(3), 294 - 97. doi:10.1002/jps.2600710307
- Fekete, S., Oláh, E., & Fekete, J. (9 de marzo de 2012). Fast liquid chromatography The domination of core-shell and very fine particles. *Journal of Chromatography A*, 1228, 57 - 71. doi:10.1016/j.chroma.2011.09.050
- Fountain, K., & Iraneta, P. (2012). UHPLC in Life Science. En D. Guillarme, & J.-L. Veuthey (Edits.). Cambridge: Royal Society of Chemistry. doi:10.1039/9781849735490-00029
- Gritti, F., Cavazini, A., Marchetti, N., & Guiochon, G. (2007). Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C18-bonded silica materials. *Journal of Chromatography A*, 1157(1-2), 289 - 303.

- Hayes, R., Ahmed, A., Edge, T., & Zhang, H. (29 de agosto de 2014). Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1357, 36-52. doi:10.1016/j.chroma.2014.05.010
- Leinweber, F., & Tallarek, U. (2003). Chromatographic performance of monolithic and particulate stationary phases Hydrodynamics and adsorption capacity. *Journal of Chromatography A*, 1006(1-2), 207 - 228. doi:10.1016/S0021-9673(03)00391-1
- Lippert, J., Baomin, X., Wu, N., & Lee, M. (1999). Fast ultrahigh-pressure liquid chromatography: On-column UV and time-of-flight mass spectrometric detection. *Journal of Microcolumn Separations*, 11(9), 631 - 43. doi:10.1002/(SICI)1520-667X(199911)11:9<631::AID-MCS1>3.0.CO;2-I
- MacNair, J., Lewis, K., & Jorgenson, a. (1997). Ultrahigh-Pressure Reversed-Phase Liquid Chromatography in Packed Capillary Columns. *Analytical Chemistry*, 69(1), 983 - 89. doi:10.1021/ac961094r
- Mazzeo, J., Neue, U., Kele, M., & Plumb, R. (01 de Dic. de 2005). Advancing LC Performance with Smaller Particles and Higher Pressure. *Analytical Chemistry*, 77(23), 460 A– 467 A. doi:10.1021/ac053516f
- Nguyen, D.-T., Guilleme, D., Rudaz, S., & Veuthey, J.-L. (2006). Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *Journal of Separation Science*, 29(12), 1836 – 48. doi:10.1002/jssc.200600189
- PerkinElmer. (04 de nov. de 2009). *Migración de métodos de HPLC a UHPLC: aplicación en el campo alimentario*. Recuperado el 22 de febrero de 2016, de <http://www.interempresas.net/Laboratorios/Articulos/35270-Migrartion-de-metodos-de-HPLC-a-UHPLC-aplicacion-en-el-campo-alimentario.html>
- Plou Gasca, F., & Salas, T. P. (2011). *Técnicas de análisis y caracterización de materiales* (2da y aum. ed.). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones científicas.

- Rambaud, L., Bichon, E., Cesbron, N., Le Bizec, B., & Andre, F. (2005). Study of 17β -estradiol-3-benzoate, 17α -methyltestosterone and medroxyprogesterone acetate fixation in bovine hair. *Analytica Chimica Acta*, 532, 165 - 76. doi: 10.1016/j.aca.2004.10.083
- Rodríguez Ferrá, R., Gómez García, L., & Conde Martín, M. (2003). *Caracterización de las progestinas inyectables y sus beneficios en la Planificación Familiar*, 19 (2). Recuperado el 22 de febrero de 2016, de Revista Cubana de Medicina General Integral: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252003000200011&lng=es&tlng=es.
- Segall, A., Hormaechea, F., Vitale, M., Perez, V., & Pizzorno, M. (1999). Development and validation of a reversed-phase liquid chromatographic method for analysis of estradiol valerate and medroxyprogesterone acetate in a tablet formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19(5), 803 - 8. doi:10.1016/S0731-7085(98)00120-4
- Seuc Jo, A., Santana Pérez, F., González Suárez, R. M., Arranz Calzado, M. C., & Fernández López, G. M. (2000). Efecto del contraceptivo inyectable Depo-provera sobre el metabolismo de la glucosa. *Rev Cubana Endocrinol*, 11(2), 98 - 104. Recuperado el 22 de febrero de 2016, de http://bvs.sld.cu/revistas/end/vol11_2_00/end06200.pdf
- Svec, F. (2003). Porous Monoliths: The Newest Generation of Stationary Phases for HPLC and Related Methods. *LC Column Technology*, 2 - 6. Obtenido de http://alfresco.ubm-us.net/alfresco_images/pharma/2014/08/22/e9fa6827-10e3-4524-a531-929ca78300da/article-59044.pdf
- Szabolcs, F., Erzsébet, O., & Jeno, F. (2012). Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles. *Journal of Chromatography A*, 1228, 57 - 71.
- United States Pharmacopeial Convention,. (2014). *The United States Pharmacopeia 37- The National Formulary 32*. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention.

Wu, N., & Clausen, A. M. (2007). Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations. *Journal of Separation Science*, 30, 1167 - 82. doi:10.1002/jssc.200700026

ANEXO

GLOSARIO

UHPLC	:	Cromatografía Líquida de Ultra Alta Eficiencia
UPLC	:	Cromatografía Líquida de Ultra Desempeño (Marca Waters)
LC-MS	:	Cromatografía líquida – Espectroscopia de Masas
GC-MS	:	Cromatografía gaseosa – Espectroscopia de Masas
HPLC	:	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.
HETP	:	Altura equivalente de platos teóricos
DIGEMID	:	Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas
ICH	:	International Conference on Harmonisation
FDA	:	Food and Drug Administration
T_R	:	Tiempo de retención
RSD	:	Desviación estándar relativa
SD	:	Desviación estándar
t/c	:	Potencia tal cual
k'	:	Factor de capacidad
DAD	:	Arreglo de diodos.
OMS	:	Organización Mundial de la Salud
IUPAC	:	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LDO/LD	:	Límite de detección
LQD/LC	:	Límite de cuantificación
S	:	Desviación estandar
CV	:	Coeficiente de variación
Ph	:	Potencial de hidrogeniones
RMN	:	Resonancia magnética nuclear.
PSI	:	Libra por pulgada cuadrada